
Etude de l'évolution de l'isolement reproducteur au sein d'un complexe d'espèces *Bemisia tabaci*

Rapport de stage



Master 2 - Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux
Année universitaire : 2013-2014

Maitre de stage : Hélène DELATTE

CIRAD, UMR PVBMT, CIRAD-Université de La Réunion,
Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre

Présenté par :
Angélique DOURDAINE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon maître de stage, Hélène Delatte, qui m'a permis de réaliser ce stage au sein du CIRAD 3P, de sa présence, sa disponibilité, sa patience et de m'avoir encadré au cours de ces quelques mois. J'ai beaucoup appris grâce à vous, merci!

Merci à Martial pour son aide technique lors de la mise en place des croisements, sans qui il aurait été impossible d'avoir ce "nombre de cages" sans oublier sa bonne humeur. Merci également Lulu pour son aide en labo de biologie moléculaire où là aussi la bonne humeur était présente.

Je remercie également Benoît Facon qui a accepté de donner de son temps pour discuter, échanger et me conseiller sur mon sujet avec un regard extérieur.

Je remercie également les autres personnes avec qui j'ai pu partager et discuter au CIRAD : Morguen, Moutou, Cédric, Maéva, Thibère et Borja.

Un grand merci aux autres stagiaires avec qui on a passé de bons moments : Aïda, Nachati, Miguel, Cédric et sans oublier ma voisine juste derrière moi dans le box, Lucille!

Enfn grand merci aux filles : Anaïs, Lakshmi, Ludivine!! On a passé de bons moments comme les plus difficiles ensembles au cours de cette année, ça été un plaisir d'être avec vous. Un clin d'œil spécial à Tachi, ces six mois de stage avec toi derrière le box fut très animé!

Sommaire

1	Introduction	3
1.1	Contexte général	3
1.1.1	Spéciation	3
1.1.2	Espèces cryptiques et biotypes	3
1.1.3	Les mécanismes d'isolements reproducteurs.....	4
1.1	Le complexe d'espèces : <i>B. tabaci</i>	5
1.1.1	Généralités.....	5
1.1.2	Nomenclature de <i>B. tabaci</i>	6
1.1.3	Biologie de <i>B. tabaci</i>	8
1.2	<i>Bemisia tabaci</i> à la Réunion	11
1.1	Problématique et objectifs du stage	1
1.2	Démarche scientifique	1
2	Matériels et méthodes.....	1
2.1	Matériel biologique.....	1
2.1.1	Insecte.....	1
2.1.1	Plante hôte	1
2.2	Démarches expérimentales des croisements inter- et intraspécifiques.....	1
2.1	Etude de la diversité nucléaire et endosymbiotique	17
2.1.1	Extraction d'ADN	17
2.1.2	Diversité nucléaire	17
2.1.1	Diversité endosymbiotique.....	17
2.1.1	Analyse des données	18
3	Résultats	19
3.1	Croisements intra et interspécifique	19
3.2	Structure génétique des populations	1

3.1	Communauté endosymbiotique secondaire	1
3.1.1	Répartition du cortège endosymbiotique.....	1
3.1.1	Comparaison du cortège endosymbiotique des parents ayant une descendance hybride ou non.....	1
4	Discussion	18
4.1	Obtention d'une descendance hybride	18
4.2	Diversité endosymbiotique chez les hybrides	23
4.3	Structure génétique	23
5	Conclusion et perspectives	23
	Bibliographie	26
	Annexes	36

1 Introduction

1.1 Contexte général

1.1.1 *Spéciation*

La spéciation est le processus évolutif par lequel de nouvelles espèces sont formées. Selon Darwin, c'est un processus progressif et continu dont le moteur est la sélection naturelle (Darwin, 1859). Chez les "mutationnistes" (De Vrie, 1906) ; (Bateson, 1922), l'évolution se fait par sauts mutationnels. C'est Dobzhansky qui réconciliera les deux écoles : la spéciation est bien un processus continu et les changements de fréquences alléliques peuvent produire des groupes d'individus génétiquement et morphologiquement différents dans un même habitat (Dobzhansky, 1935). La spéciation n'est plus uniquement un problème de colonisation et d'occupation de nouvelles niches écologiques¹, mais également de déploiement de barrières d'isolement reproducteur entre espèces (Dobzhansky, 1937). Mayr est le premier à définir le concept biologique de l'espèce « un groupe de populations naturelles, effectivement ou potentiellement interfécondes, génétiquement isolées d'autres groupes similaires » (Mayr, 1942).

L'isolement reproducteur est le résultat de la mise en place de barrières aux flux génétiques entre deux espèces et ne résulte pas systématiquement en la mise en place de barrières physiques empêchant tout contact entre populations. L'isolement reproducteur est un processus complexe affectant l'ensemble du génome. En effet, si deux populations divergentes continuent à partager un ensemble de gènes, ces populations ne peuvent être considérées comme étant reproductivement isolées (Wu and Ting, 2004).

1.1.2 *Espèces cryptiques et biotypes*

Des populations peuvent constituer des espèces distinctes suivant les concepts biologiques (elles sont isolées reproductivement l'une de l'autre) et/ou phylogénétiques (leurs lignées génétiques ont une importante différenciation génétique) sans pour autant montrer de différences morphologiques, elles sont alors appelées "espèces cryptiques". Bien souvent, les espèces cryptiques sont des espèces qui sont, ou ont été classées comme une seule espèce nominale sur la base de critères morphologiques (Bickford et *al.*, 2007). Les espèces au sein

¹ Place occupée par une espèce dans un écosystème

d'un complexe d'espèces cryptiques divergent souvent dans leur habitat ou dans leur histoire de vie

Les études se concentrant sur la génétique et l'écologie de lignées divergentes au sein d'une espèce permettent d'explorer les processus évolutifs et démographiques dans les premiers stades de la spéciation (Losos and Glor, 2003). Dans ces premières phases de différenciation, les unités évolutives sont souvent décrites comme des «biotypes» et peuvent représenter des étapes "intermédiaires" entre des populations polymorphes et des espèces distinctes . Les biotypes ont été largement documentés à travers différents taxons, particulièrement chez les insectes phytophages qui peuvent présenter des adaptations à différentes espèces d'hôtes, ainsi que des différences dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Drès and Mallet, 2002). C'est notamment le cas du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae), où un biotype a été associé à un hôte (trèfle rouge pour l'un luzerne pour l'autre) aux Etats-Unis (Hawthorne and Via, 2001).

1.1.3 ***Les mécanismes d'isolements reproducteurs.***

Plusieurs concepts permettent d'expliquer l'évolution de populations distinctes en espèces cryptiques. En effet, comme vu précédemment, le concept d'espèce est basé sur l'existence de barrières d'isolement à la reproduction entre espèces.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'existence de barrières d'isolements. En effet, ces mécanismes peuvent être distingués en fonction de leur nature pré- ou post- reproductrice. L'isolement reproducteur peut, en fait, agir à chaque étape de la reproduction et du développement (pour revue Coyne and Orr, 2004).

L'isolement pré-zygotique, agit avant la fécondation en diminuant la probabilité de formation d'hybrides par une absence de possibilité de fécondation interspécifique lié au fait, par exemple, que les deux espèces présentent des caractéristiques écologiques ou éthologiques différentes. Ces caractéristiques peuvent être : anatomique par incompatibilité des organes reproducteurs, un décalage des périodes de reproduction ou de floraison (Rice, 1987), géographique si les milieux sont fragmentés, une faible attractivité ou une non reconnaissance entre partenaire sexuels potentiels (chants différents chez les oiseaux : Irwin, (2000), Podos, (2007), des patrons de coloration différents chez les papillons : Jiggins et al (1997))

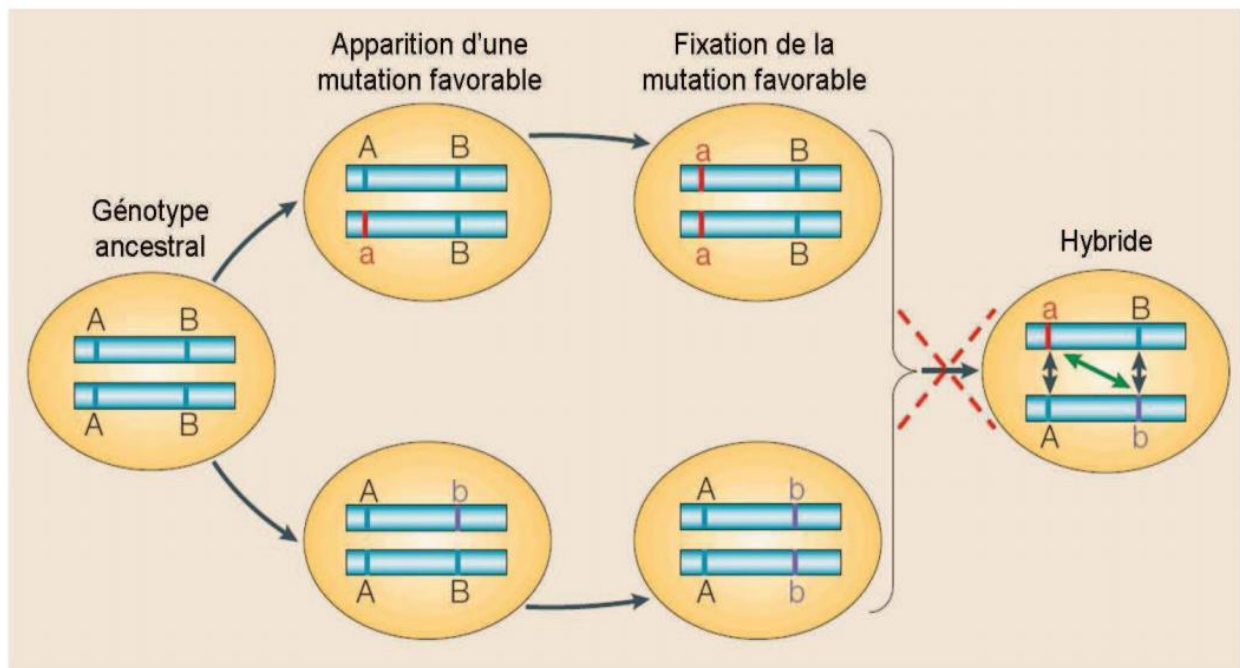


Figure 1 : Représentation schématique du modèle de Dobzhansky-Muller.

A et B sont les génotypes ancestraux ; **a** et **b** sont les mutations favorables. Pour l'hybride, les doubles flèches noires représentent les locus divergents incriminés et la double flèche verte correspond aux interactions épistatiques négatives entre les allèles incompatibles. La croix rouge représente la létalité des hybrides lorsque l'incompatibilité est totale entre les allèles **a** et **b**. Schéma modifié issu de Ting et Wu (2004).

L'isolement post-zygotique complet ou partiel entre deux espèces correspond à la production de zygotes hybrides mais qui auront généralement une valeur sélective plus faible (létalité des jeunes stades de développement, stérilité de la descendance, dépression hybride). Cet isolement peut être dû à un isolement gamétique, soit par incompatibilité gamétique ou par compétition gamétique (Howard, 1999). Dans les barrières post-zygotiques on peut distinguer : les causes extra-chromosomiques (occasionnées par des transferts de matériel génétique entre les génomes (Kazazian, 2004), les remaniements chromosomiques (Rieseberg, 2001) et les causes géniques (incompatibilité des gènes entre espèces divergentes (Presgraves, 2003). La barrière post-zygotique à la reproduction entre espèces, aussi appelée incompatibilité hybride, peut être le résultat d'interactions épistatiques entre allèles qui diffèrent entre espèces et se retrouvent chez l'hybride ensemble. En effet, il a souvent été observé que des incompatibilités génétiques entre différentes espèces naissantes ou des populations différenciées ont tendance à être récessifs, c'est un modèle d'incompatibilités génique dit de Dobzhansky -Muller (Orr, 1995). Pour suivre le modèle de Dobzhansky-Muller, chaque gène doit : i) diminuer la fitness de l'hybride, ii) avoir divergé fonctionnellement entre les deux espèces qui s'hybrident et iii) rentrer en interaction avec le gène "partenaire" de l'autre espèce pour causer l'incompatibilité hybride (figure 1).

1.1 Le complexe d'espèces : *B. tabaci*

1.1.1 Généralités

Parmi les 1556 espèces d'aleurodes décrites appartenant à 161 genres (Martin and Mound, 2007), peu affectent les productions agricoles. Le genre *Bemisia* contient 37 espèces et serait probablement originaire de l'Asie (Mound and Halsey, 1978). *B. tabaci* a été décrite pour la première fois en Grèce en 1889 par Gennadius sur des plants de tabac. *B. tabaci* peut avoir pour origine l'Inde (Fishpool and Burban, 1994). Cependant, des études phylogénétiques plus récentes ont permis de déduire que l'Afrique serait l'origine la plus probable de *B. tabaci* (Boykin et al., 2007 ; De Barro et al., 2011). *B. tabaci* est présent dans tout le globe à l'exception des pôles, mais prédomine dans les zones tropicales et subtropicales (Perring, 2001).

L'aleurode *B. tabaci* (Figure 2), est un exemple d'espèces cryptiques. Toutefois, ce complexe d'espèces a longtemps été considéré (jusqu'en 2011) comme un complexe de populations ou


Ordre	Hemiptera	
Sous-ordre	Sternorrhyncha	
Super-famille	Aleurodidae	
Famille	Aleyrodidae	
Genre	Bemisia	

Figure 2 : Classification de *Bemisia tabaci*. (Photo Scott Bauer, USDA)

de biotypes (pour revue De Barro et 2011). Par ailleurs, le manque de données biologiques et une image claire de la structure phylogénétique de *B. tabaci* signifiait qu'il n'y avait pas suffisamment de données pour soutenir le statut d'espèce (De Barro, 2005). Depuis lors, une série d'études, à la fois biologiques et moléculaires a été entreprise, ce qui a conduit à définir *B. tabaci* comme un complexe de 24 espèces (De Barro et *al.*, 2011).

B. tabaci est l'un des ravageurs les plus envahissants des cultures protégées à travers le monde. Depuis plus d'une quinzaine d'années, il est passé du stade de ravageur d'importance secondaire à celui de ravageur majeur de nombreuses cultures. En effet, *B. tabaci* est capable de causer des dégâts directs par extraction de sève affaiblissant la plante et des dégâts indirects par des troubles phytotoxiques. Les virus transmis par les aleurodes sont répartis dans 4 genres viraux appartenant à 4 familles virales : le genre Begomovirus (famille Geminiviridae), le genre Crinivirus (famille Closteroviridae), le genre Ipomovirus (famille Potyviridae) et le genre Carlavirus (famille Flexiviridae). *B. tabaci* est le seul vecteur pour les bégomovirus (Jones, 2003), capable de causer par exemple, l'enroulement jaunissant des feuilles de la tomate ou *Tomato Yellow Leaf Curl* (TYLC) (Annexe 1), la plus grave maladie virale de la tomate dans les régions tropicales et subtropicales (Czosnek and Laterrot, 1997 ; Moriones and Navas-Castillo, 2000). La lutte contre *B. tabaci* est devenue un problème émergent à la fois pour les producteurs et les scientifiques.

B. tabaci est un complexe d'espèces qui possède des espèces qui sont indigènes selon les pays (Liu et *al.*, 2007 ; Delatte et *al.*, 2011) mais également des espèces qui sont plus invasives que d'autres. C'est notamment le cas de l'espèce "Middle East-Asia Minor 1" ou MEAM1 (anciennement biotype B) dont le premier grand événement d'invasion a débuté vers la fin des années 1980 principalement par le commerce des plantes ornementales (Broadbent, 1989 ; Cheek and Macdonald, 1994). L'espèce MEAM1 s'est étendue depuis son aire d'origine, le Moyen-Orient de l'Asie mineure jusqu'à au moins 54 pays. L'autre espèce invasive connue est "Mediterranean" ou MED (anciennement biotype Q) dont la propagation mondiale a débuté depuis les pays limitrophes du bassin méditerranéen (De Barro et *al.*, 2011)-

1.1.2 *Nomenclature de B. tabaci*

Après la découverte de *B. tabaci* sur des plants de tabac, le premier nom donné par Gennadius fut *Aleurodes tabaci* (Gennadius, 1889). Toutefois, plusieurs dénominations lui ont été

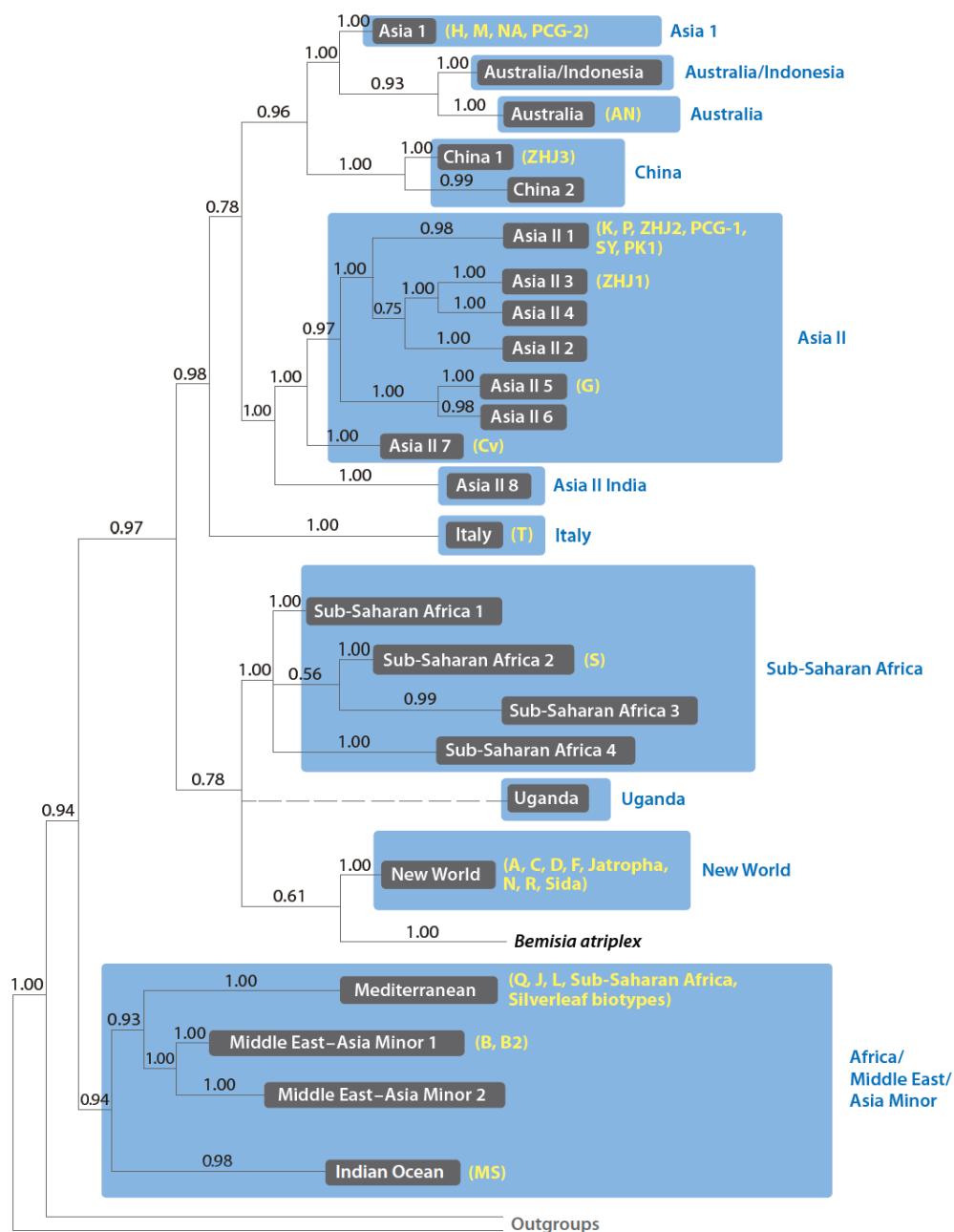


Figure 3 : Phylogénie de *Bemisia tabaci* établie à partir d'analyse de séquences du gène mitochondrial cytochrome oxydase 1 (mt CO) : 24 espèces cryptiques (boîtes grises), avec l'ancienne appellation (biotypes) en jaunes, réparties dans 11 grands groupes (Figure extraite de De Barro et al. 2011).

attribuées indépendamment à travers le monde. Le genre *Bemisia* a été décrit pour la première fois en 1914 (Quaintance and Baker, 1914) et en 1936, toutes ces espèces ont été regroupées sous le même nom d'espèce par Takahashi qui a proposé de renommer cet aleurode par *B. tabaci* (Takahashi, 1936). Sa diversité géographique et sa large gamme d'hôtes ont donné lieu à plusieurs noms communs différents associés à des plantes hôtes, à savoir l'aleurode du tabac, du coton ou de la patate douce. Ce problème est exacerbé par la nature polyphage de l'aleurode. En effet, *B. tabaci* est une espèce généraliste disposant d'une gamme d'alimentation large et / ou d'un large éventail de plantes hôtes pour la reproduction, avec plus de 600 espèces différentes de plantes hôtes (Oliveira et al., 2001).

Le concept de biotypes pour *B. tabaci* a été utilisé pour la première fois dans les années 1950, lors de l'invasion du sud des États-Unis par une population de *B. tabaci* qui se comportait très différemment de la population indigène. En effet, la population envahissante présentait des variations dans les traits biologiques et écologiques mais elle était indiscernable morphologiquement (Mound, 1963). *B. tabaci* est une espèce difficile à identifier des autres aleurodes à cause du manque de caractères morphologiques clairs pour leur identification (Mound, 1963 ; Bedford et al., 1994). La complexité écologique de *B. tabaci* a donc été reconnue dès les années 1950. Cette reconnaissance a conduit au développement du concept que *B. tabaci* était composé d'une série de biotypes (Costa and Brown, 1991 ; Bedford et al., 1994). Depuis lors, il y a eu une prolifération de biotypes décrits avec un nombre supérieur à 20 (Perring, 2001). En 1991, le terme de biotype a été introduit à la nomenclature de *B. tabaci*. Ces désignations se sont basées sur des données moléculaires telles que les allozymes, ainsi que d'autres outils moléculaires tel que les RAPD-PCR (Gawel and Bartlett, 1993 ; De Barro and Driver, 1997). C'est l'utilisation d'outils plus récents tels que les séquences des gènes 16s mitochondrial, du cytochrome oxydase mitochondrial 1 (mtCO1) et des espaceurs internes transcrits 1 (ITS1) qui a permis de réaliser des groupes taxonomiques bien différenciés (Frohlich et al., 1999). A partir de ces premiers résultats et des analyses phylogénétiques complètes des séquences présentes sous GeneBank, une première proposition taxonomique a été faite : séparation en 24 espèces cryptiques réparties en 11 groupes génétiques (Boykin et al., 2007). Suite à cette première proposition et plusieurs études biologiques (cf. paragraphe 1.1.3) une nouvelle nomenclature est en cours d'adoption depuis 2011 (De Barro et al., 2011) (Figure 3). En effet, cette étude a mis en avant que *B. tabaci* était

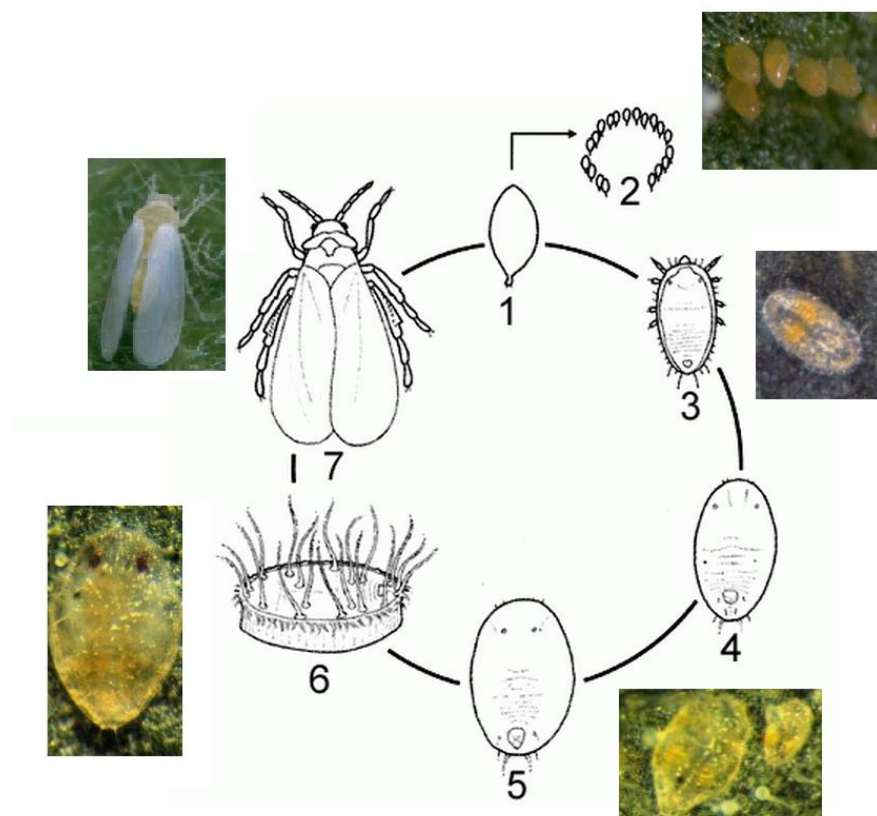


Figure 4 : Cycle de développement de *Bemisia tabaci*.

1°) et 2°) Oeufs (0.25 mm) ; 3°) Larve L1 (0.3 mm) ; 4°) Larve L2 (0.37 mm) ; 5°) Larve L3 (0.51 mm) ; 6°) Larve L4 ou "pupe" (0.73 mm) ; 7°) Adulte (1 mm) (ephytia.inra.fr, erec.ifas.ufl.edu).

Tableau 1 : Durées de développement moyen en jours de chaque stade immature chez deux espèces de *Bemisia tabaci* (MEAM1 et IO) de l'œuf jusqu'à l'adulte à 25°C (données extraites de Delatte et *al.* 2009).

Œuf - L1		L1 - L2		L2 - L3		L3 - L4		L4 - Pupe		Pupe - Adulte	
MEAM1	IO	MEAM1	IO	MEAM1	IO	MEAM1	IO	MEAM1	IO	MEAM1	IO
7.8	7.4	3.9	4.9	2.6	3.2	3.2	2.9	3.4	3.7	2.7	2.7

un complexe d'espèces cryptiques composé de groupes génétiques particuliers trop éloignés pour s'hybrider et que le terme de "biotype" n'était plus approprié (De Barro et *al.*, 2011).

1.1.3 **Biologie de *B. tabaci***

Fécondité de *B. tabaci*

B. tabaci est un insecte arrhénotoque haplo-diploïde, ce qui signifie que les œufs non fécondés donnent une descendance mâle haploïde et les œufs fécondés produisent une descendance femelle diploïde (Byrne and Bellows Jr, 1991). De plus, une femelle est capable de pondre entre 60 et 300 œufs au cours de sa vie selon la plante hôte et la température (Gerling et *al.*, 1986)

Cycle de développement

Son cycle de vie comporte six stades : un stade œuf, trois stades larvaires, un faux stade pupal et le stade adulte (Figure 4). L'œuf, de forme ellipsoïdale, est rattaché à un pédicelle sur le tissu foliaire (Gerling, 2002). A l'éclosion, le "crawler", stade pendant lequel le juvénile est mobil dans les premières heures, s'établit près du site d'oviposition. Quatre stades larvaires se suivent ensuite durant lesquels les larves sont immobiles. Le dernier stade se transforme en "pupe" pour devenir ensuite un adulte ailé. Son cycle varie entre 23.2 et 24.6 jours à 25°C pour les espèces MEAM1 et IO (Tableau 1) et dépend de plusieurs paramètres tels que la température et l'humidité relative (Delatte et *al.*, 2009).

Endosymbiose

La symbiose est l'association étroite entre deux espèces distinctes. L'endosymbiose est quant à elle une symbiose dans laquelle le symbiote (appelé endosymbiote) est localisé à l'intérieur des cellules de l'hôte (Buchner, 1965).

Chez les insectes, des associations symbiotiques sont souvent retrouvées. En effet, les insectes phloémiens (pucerons, aleurodes, cochenilles) possèdent des bactéries endosymbiotique qui sont obligatoires (primaires) et facultatives (secondaires) (Moran and Mira, 2001). Les endosymbiotes obligatoires synthétisent des métabolites essentiels et sont transmis verticalement par voie maternelle *via* une transmission trans-ovarienne. Pour les endosymbiontes secondaires, la transmission est principalement verticale, mais la

transmission horizontale peut s'effectuer s'il y a contact avec d'autres individus infectés (Buchner, 1965 ; Baumann et *al.*, 2006 ; Clark et *al.*, 2010).

Les endosymbiontes peuvent jouer un rôle important dans l'écologie et l'évolution des insectes en affectant d'importantes caractéristiques comme la résistance aux parasitoïdes (Oliver et *al.*, 2003), la transmission virale (Gottlieb et *al.*, 2010), la reproduction (Weeks and Stouthamer, 2004). De plus, la présence simultanée de plusieurs endosymbiotes dans un même individu peuvent créer des interactions et affecter le développement ou le maintien d'un endosymbiote (Vautrin and Vavre, 2009), à cause du partage d'un espace et des ressources qui sont limités dans le corps des arthropodes.

Lorsque les endosymbiontes jouent un rôle dans l'évolution de leurs hôtes, particulièrement dans la manipulation de la reproduction, cela peut provoquer un isolement reproducteur et la spéciation (Engelstädter and Telschow, 2009; Moran et *al.*, 2009; Feldhaar, 2011). Il semblerait que ces phénomènes d'isolement reproducteur et de spéciation seraient en cours chez *B. tabaci* (Zchori-Fein and Brown, 2002 ; Nirgianaki et *al.*, 2003). Chez *B. tabaci*, l'endosymbiote obligatoire est *Portiera aleyrodidarum*. Cet endosymbiote est localisé dans le cytoplasme des bactériocytes², dans un organe appelé bactériome³ chez les insectes (Baumann, 2005) et intervient dans la nutrition de son hôte, en synthétisant par exemple des acides aminés absents du phloème dont se nourrit l'insecte (Thao et *al.*, 2004). En ce qui concerne les endosymbiotes secondaires, *B. tabaci* en possède sept qui sont retrouvés dans les bactériocytes et/ou à travers de l'hôte (Moran and Telang, 1998) : *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Hamiltonella defensa*, *Cardinium*, *Arsenophonus*, *Fritschea bemisia* (Baumann, 2005) ; (Gottlieb et *al.*, 2006) et *Hemipteriphilus asiaticus* (Bing et *al.*, 2013). Chaque espèce de *B. tabaci* peut présenter une ou plusieurs combinaisons spécifiques d'endosymbiotes secondaires. Ces différentes combinaisons de cortèges apparaissent souvent comme spécifiques d'une espèce de *B. tabaci* (Chiel et *al.*, 2007).. Les endosymbiotes dont les rôles sont partiellement connus chez *B. tabaci* sont : *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Wolbachia*. *Hamiltonella* augmenterait l'efficacité de transmission du TYLCV (Gottlieb et *al.*, 2010). *Rickettsia* jouerait plusieurs rôles chez *B. tabaci*, il serait capable d'augmenter la

² Cellules spécialisées retrouvées chez certains insectes, hébergeant des endosymbiotes

³ Agrégation de bactériocytes

Tableau 2 : Résumé de l'incompatibilité de reproduction entre 11 espèces supposées du complexe d'espèce de *Bemisia tabaci* à partir des études de croisements (Tableau extrait de Xu et *al.* 2010).

Female source	Male source ^a											References ^c
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1. Mediterranean	● ^b	Ø						Ø				O, By, R
2. Middle East-Asia Minor 1	Ø	●	⊗	⊗	⊗	⊗				⊗		Be, By, C, D, Li, Lu, M4, R, P, T, Z
3. Asia I		⊗	●		⊗					⊗		Be
4. Australia		⊗		●								D, Li
5. Asia II 1		⊗	⊗		●	⊗				⊗		Be, Lu, T
6. Asia II 2		⊗			Ø	●						Li, T, Z
7. Asia II 5							●	⊗	⊗			M4
8. Sub-Saharan Africa 1	Ø						⊗	●	Ø			M4, O
9. Sub-Saharan Africa 2							⊗	Ø	●		⊗	M1, M4
10. New World		⊗	⊗		⊗					●		Be, C, P
11. Uganda									⊗		●	M4

^a Les codes source des mâles correspondent à ceux des sources femelles listés dans la première colonne.

^b ● compatibilité de reproduction complète, Ø pas de compatibilité de reproduction, ⊗ peu de femelles F1 produites mais fertilité non testée.

^c Be, (Bedford et *al.*, 1994) ; By, (Byrne et *al.*, 1995) ; C, (Costa et *al.*, 1993) ; D, De Barro and Hart (2000) ; L, (S. S. Liu et *al.*, 2007); Lu, (Luan et *al.*, 2008) ; M1, (Maruthi et *al.*, 2001) ; M4 (Maruthi et *al.*, 2004) ; O, (Omondi et *al.*, 2005) ; P, (Perring et *al.*, 1993) ; (Ronda et *al.*, 1999) ; T, (Xu et *al.*, 2010); Z, (Zang and Liu, 2007).

thermotolérance des individus (Brumin et *al.*, 2011), la valeur sélective⁴ (Himler et *al.*, 2011) tout en augmentant la sensibilité aux insecticides (Kontsedalov et *al.*, 2008) de ces populations. Pour finir, *Wolbachia* augmenterait la valeur sélective et protégerait les populations porteuses des parasitoïdes (Xue et *al.*, 2012).

Incompatibilité de reproduction

B. tabaci étant un complexe d'espèces, les espèces diffèrent donc au niveau moléculaire et peuvent présenter un isolement reproducteur complet ou incomplet en raison de l'incompatibilité de reproduction (Oliveira et *al.*, 2001 ; De Barro et *al.*, 2011). Le débat sur le fait que *B. tabaci* soit un complexe d'espèces était basé sur le "concept d'espèce biologique" (Dobzhansky, 1937) qui nécessite la production de descendance F1 fertile. De plus, Lane (1977) a proposé qu'un complexe d'espèces est constitué de populations qui sont reproductivement isolées et qui ont un flux de gènes distinct sans changement morphologique associé. Depuis 1993, en raison de la difficulté taxonomique dans l'identification fiable des populations de *B. tabaci* (Rosell et *al.*, 1997), plusieurs études ont examiné leur capacité à se croiser, parfois avec des résultats contradictoires. Certaines études n'ont pas pu démontrer des croisements entre espèces (Costa et *al.*, 1993 ; Bedford et *al.*, 1994), alors que d'autres ont rapporté des hybrides (Liu et *al.*, 1992 ; De Barro and Hart, 2000). Cependant, dans ces études, la fertilité des hybrides n'a été pas déclarée ou n'a pas été formulée. Selon la synthèse de De Barro et *al.* (2011), l'article indique que les membres des 24 sous-groupes (Figure 3) sont pour la plupart incompatibles reproductivement ou partiellement (Tableau 2).

Chez *B. tabaci*, lorsqu'il y a un isolement reproducteur, plusieurs observations peuvent être constatées : une diminution de la taille de la population, une augmentation de la proportion de mâles, moins d'œufs produits par les femelles accouplées avec des mâles de biotype différent (De Barro and Hart, 2000). Les isolements pré-zygotique et post-zygotique conduisant à un échec de la fécondation, comme développé dans la partie 1.1.3, pourraient expliquer ces observations. Un isolement pré-zygotique a été montré par une expérience réalisée par De Barro et Hart (De Barro and Hart, 2000). En effet, l'étude sur la fécondité a démontré que des mâles et des femelles de différentes espèces ont été incapables de reconnaître la différence entre espèces et sont entrés dans un comportement de cour. Ils ont donc suggéré la présence

⁴ Taux de survie et fécondité

d'un mâle incompatible qui détourne la femelle de la ponte. Cela a été appelé "hypothèse du mâle distrayant". Des observations similaires ont été faites dans différentes études, entre plusieurs espèces (Maruthi et *al.*, 2004 ; Liu et *al.*, 2007 ; Sun et *al.*, 2011).

Il existe également un isolement à la reproduction correspondant à une incompatibilité génétique. Dans ce contexte, il est très probable que le mélange des deux génomes par le biais de l'hybridation et de la recombinaison affecte les mâles haploïdes plus que les femelles diploïdes. Par ailleurs, malgré la présence d'hybrides produits conduisant à une copulation puis à une fécondation, la faible proportion d'hybrides montre un haut degré d'incompatibilité entre espèces (De Barro and Hart, 2000).

L'autre barrière post-zygotique serait due à la présence des endosymbiotes. En effet, comme traité dans la partie "endosymbiose", les endosymbiotes sont capable d'affecter la reproduction de leur hôte, mais le rôle des endosymbiotes secondaires dans l'isolement reproducteur reste encore inconnu. Cependant, une étude de 2011 effectuée à la Réunion a mis en évidence le rôle potentiel des endosymbiotes *Arsenophonus* et/ou *Cardinium* dans l'isolement reproducteur partiel chez les espèces MEAM1 et "Indian Ocean" (IO, anciennement appelé biotype Ms) (Thierry et *al.*, 2011).

1.2 Bemisia tabaci à la Réunion

B. tabaci a été décrit pour la première fois à la Réunion en 1938 (Bourriquet, 1938) et plus tard en 1953 (Luziau, 1953). *B. tabaci* n'a plus été détecté jusqu'à l'apparition d'une sévère épidémie de TYLCV en 1997 (Peterschmitt et *al.*, 1999). Cette épidémie a été associée à une augmentation de la population du vecteur *B. tabaci*. Depuis, *B. tabaci* est retrouvé sur la plupart des cultures maraichères, les plantes ornementales et sur toutes les aires de production de la tomate à la Réunion. Le rendement perdu à cause du TYLCV peut atteindre 85% sur les cultivars les plus sensibles (Reynaud et *al.*, 2003).

En 2005, une étude de la population de *B. tabaci* à la Réunion a permis de mettre en évidence la présence de deux espèces cryptiques sur l'île (Delatte et *al.*, 2005). L'espèce MEAM1 et l'espèce IO. L'espèce MEAM1 est une espèce mondialement invasive, nouvellement introduite et dominante sur l'île qui serait arrivée à la fin des années 90. Son invasion récente pourrait s'expliquer par la possibilité de plusieurs introductions de l'espèce MEAM1 sur l'île (Delatte et *al.*, 2005). L'espèce IO serait quant à elle indigène de la région du sud-ouest de

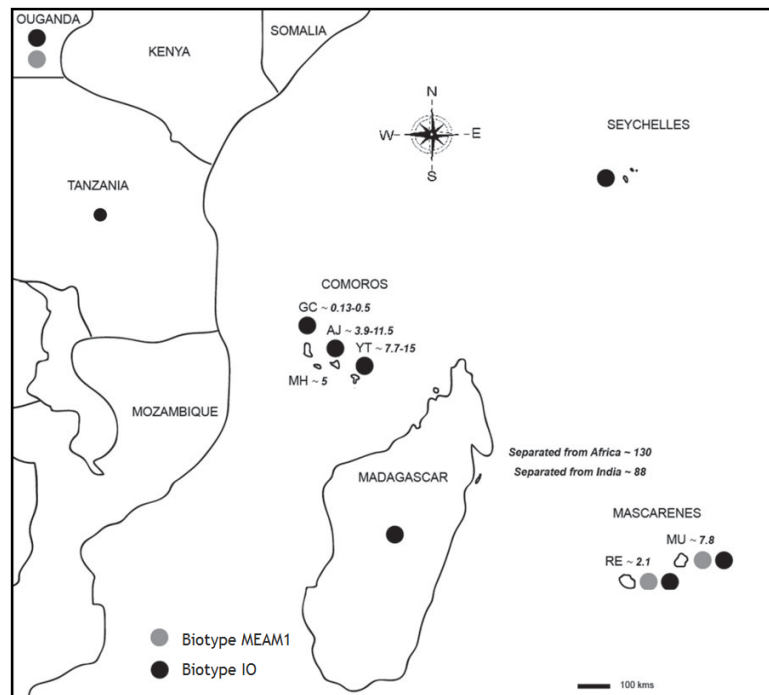


Figure 5 : Répartition des espèces MEAM1 et IO de *Bemisia tabaci* au Sud-ouest de l'Océan Indien (Figure modifiée extraite de Delatte et *al.* 2011).

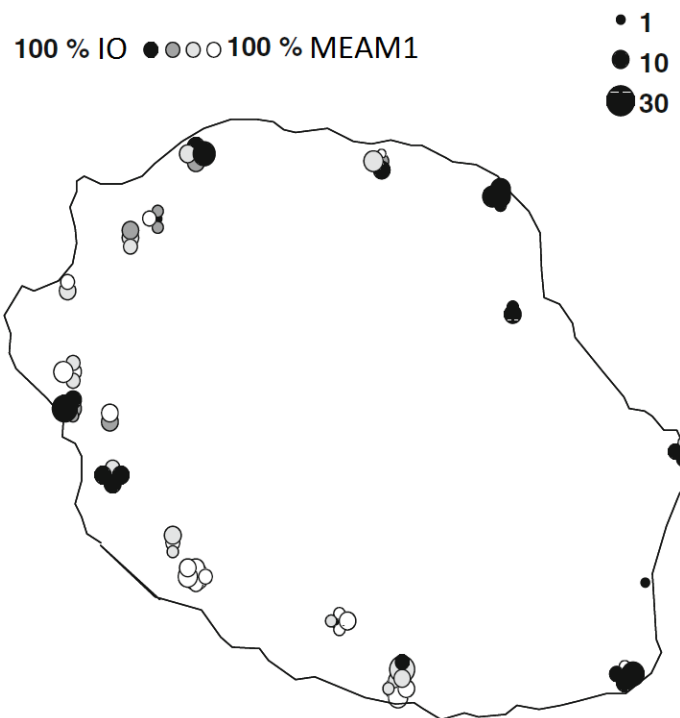


Figure 6 : Proportions des espèces MEAM1 (Biotype B) et IO (Biotype Ms) retrouvées à la Réunion. (Figure modifiée extraite de Delatte et *al.*, 2009).

l'océan Indien (Delatte et *al.*, 2005). Une troisième espèce est présente à la Réunion, l'espèce MED qui serait arrivée sur l'île en 2010 (Thierry et *al.*, 2011). Ces trois espèces appartiennent au même groupe de haut niveau appelé "Africa/ Middle Est/ Asia Minor" (Figure 3). Ces trois espèces sont retrouvées en sympatrie à la Réunion. L'étude sur laquelle portera le stage se focalisera essentiellement sur les espèces MEAM1 et IO.

Les espèces MEAM1 et IO sont toutes les deux retrouvées dans la région Sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI). L'espèce MEAM1 est essentiellement retrouvée à La Réunion, Maurice et à l'Ouganda, alors que l'espèce IO a une répartition plus élargie. En effet, l'espèce IO est retrouvée à Madagascar, Maurice, Comores, Seychelles et Réunion (Delatte et *al.*, 2011) (Figure 5).

Les espèces MEAM1 et IO possèdent des différences écologiques visibles, notamment en ce qui concerne les plantes hôtes. L'espèce MEAM1 est retrouvée à une faible fréquence dans les régions humides ce qui pourrait refléter des préférences climatiques et/ou la distribution des plantes hôtes. En effet, l'espèce MEAM1 est surtout retrouvée dans le sud ouest de l'île de la Réunion, au niveau des cultures maraîchères. L'espèce IO est quant à elle retrouvée principalement au niveau des adventices qui sont abondants dans l'est où il y a peu de cultures maraîchères (Delatte et *al.*, 2005, 2009) (Figure 6). Par ailleurs, des hybrides issus des espèces MEAM1 et IO ont été rapportés par l'étude de Delatte et *al.* (2006) (Figure 6). D'après cette étude, les hybrides seraient fertiles puisque qu'ils ont été observés après plusieurs générations (résultats basés sur des données génétiques uniquement, aucune expérimentation de biologie n'a été conduite sur cet aspect). Néanmoins, ces hybrides ont été trouvés à faible fréquence dans les champs sur l'île.

A la Réunion, en plus de l'endosymbiote primaire, *Portiera aleyrodidarum*, l'étude de Thierry et *al.* (2011) a permis de mettre en évidence la présence de quatre endosymbiotes : *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Cardinium* et *Arsenophonus*. Le cortège endosymbiotique retrouvé en majorité chez l'espèce MEAM1 à La Réunion est représenté par *Hamiltonella* et *Rickettsia* en bi-infection⁵. Chez l'espèce IO, c'est le cortège *Cardinium* et *Arsenophonus* en bi-infection qui est le plus représenté (Thierry et *al.*, 2011).

⁵ Le cortège endosymbiotique est composé de deux endosymbiotes différents

1.1 Problématique et objectifs du stage

Comme nous l'avons vu précédemment, au sein du complexe d'espèce de *B. tabaci*, il a été prouvé que certaines de ces espèces étaient capables de s'hybrider entre elles, bien qu'elle soit partielle (Thierry et *al.* 2011). C'est notamment le cas entre les espèces MEAM1 et IO à La Réunion. Ces résultats prouvant l'hybridation interspécifique ont été exclusivement obtenus avec des aleurodes échantillonnés sur le terrain, sur lesquelles des analyses génétiques et du cortège endosymbiotiques ont été réalisées (Thierry et *al.* 2011). Or, aucun essai biologique n'a été effectué pour vérifier la fertilité et valeur sélective de ces hybrides, ainsi que du cortège endosymbiotique porté par les descendants (connaissant les parents).

Comme pour les études de De Barro & Hart (2000), de Liu et *al.* (2007) ou encore Wang et *al.* (2012), des croisements interspécifiques ont été mis en place. La problématique s'est articulé autour du suivi des générations d'hybrides entre les deux populations MEAM1 et IO du complexe d'espèces de *B. tabaci*

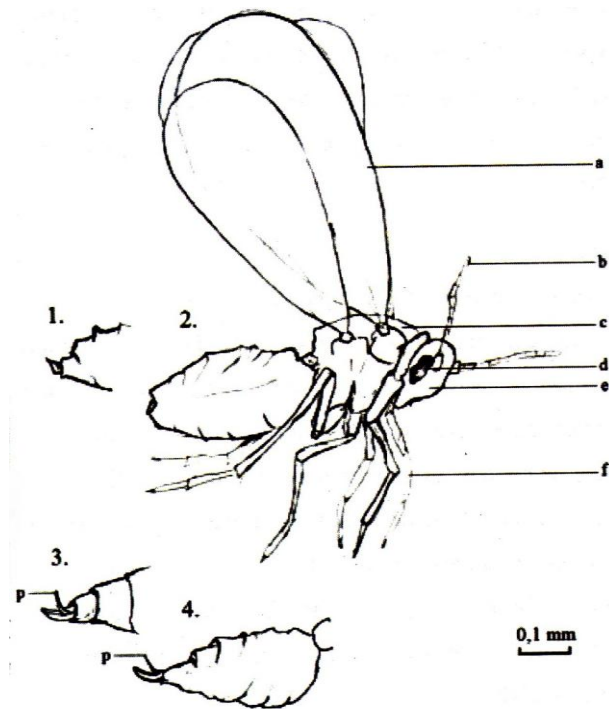
Plusieurs objectifs ont été mis en place pour répondre à cette problématique :

- Regarder la possibilité d'obtenir une descendance hybride entre les espèces MEAM1 et IO sur plusieurs générations.
- Détecter un effet sur la valeur sélective des populations hybrides
- Le cortège endosymbiotique que portent les hybrides issus des deux croisements par rapport au type de mère (MEAM1 ou IO).

1.2 Démarche scientifique

Pour suivre cette évolution au cours du temps, deux types de croisements interspécifiques ont été mis en place (σ^7 MEAM1x φ IO et φ MEAM1 x σ^7 IO) A chaque génération les individus sont récoltés, comptés et sexés.

Les ADN à chaque génération ont été dans un second temps extraits, puis chaque individu a été analysé. Les insectes sont identifiés à l'aide d'un marqueur moléculaire qui discrimine les individus des espèces MEAM1 et IO. Par la suite, une PCR multiplexe utilisant dix marqueurs microsatellites nucléaires a été effectuée pour voir la diversité allélique au sein des parents et dans leur descendance pour les deux types de croisement. Dans un troisième temps, l'identification des cortèges endosymbiotiques à chaque génération à été faite par une PCR



La Réunion en 2001 pour l'espèce MEAM1 (Delatte et *al.*, 2005) et en 2009 pour l'espèce IO

Figure 7 : Dessin d'observation de *B. tabaci*.

La femelle peut présenter deux formes d'abdomen : 1) dévaginé ; 2) invaginé. Différente vue de l'extrémité de l'abdomen du mâle : 3) vue de dessus ; 4) vue de profil ; p). Autres parties du corps : a) aile ; b) antenne ; c) thorax ; d) œil ; e) tête ; f) patte. (Auteur : Colombe Valette).



Figure 8 : Dispositif mis en place pour les croisements. A°) Cage de 20cm×20cm×20cm. B°) Plant de coton de 20 jours sur lesquels les aleurodes ont été déposés à la surface de la feuille. Sur le pot un Sticky Trap bleu a été ajouté..

multiplexe ciblant l'ADN ribosomique des quatre endosymbiotes chez les deux espèces. Des PCR duplexe et simplexe ont été mis en place pour vérifier le cortège de certains individus ciblant soit les endosymbiotes de l'espèce MEAM1 (*Cardinium* et/ou *Arsenophonus*), soit les endosymbiotes de l'espèce IO (*Rickettsia* et/ou *Hamiltonella*).

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Insecte

L'étude s'est portée sur deux espèces retrouvées à la Réunion : l'espèce MEAM 1 et IO. Les individus sont élevés dans des cages d'élevages entretenues par le laboratoire de l'UMR PVBMT. Ces lignées d'élevage ont été obtenues à partir d'adultes prélevés en plein champs à (Thierry et *al.*, 2011). Ces lignées sont maintenues sur des plants de coton (*Gossypium Hirsutum*, L. cv. "Zhe-Mian 1793", Malvaceae) dans deux salles climatiques différentes (une par espèce pour éviter les contaminations) à 25°C avec une humidité relative de 50% à 70% et une photopériode de 12h : 12h.

2.1.1 Plante hôte

Des plants de coton ont été utilisés dans les expériences de croisements. Ces plants ont été cultivés dans des pots de 1,5L avec un mélange de tourbe et de scorie autoclavé auparavant. Les pots ont été placés dans une enceinte climatique sans insecte à 25°C avec un taux d'humidité relatif de 50% à 70% avant usage. Les plants de coton âgés d'environ 20 jours ont été ensuite utilisés pour les croisements.

2.2 Démarches expérimentales des croisements inter- et intraspécifiques

Des feuilles avec la présence de pupes (dernier stade larvaire avec des yeux rouges) ont été prélevées dans les cages d'élevages des espèces MEAM1 et IO le jour précédent les croisements. Les feuilles ont été placées dans des boîtes de pétri. Dès leur émergence, les adultes ont été récoltés à l'aide d'un aspirateur à bouche, mis individuellement dans des boîtes de pétri et sexés. La distinction du sexe se fait à l'aide d'une loupe binoculaire (40×) car le complexe d'espèces *B. tabaci* présente un dimorphisme sexuel. En effet, les femelles sont plus grandes et plus grosses que les mâles (Delatte et *al.*, 2009). De plus, les mâles possèdent un

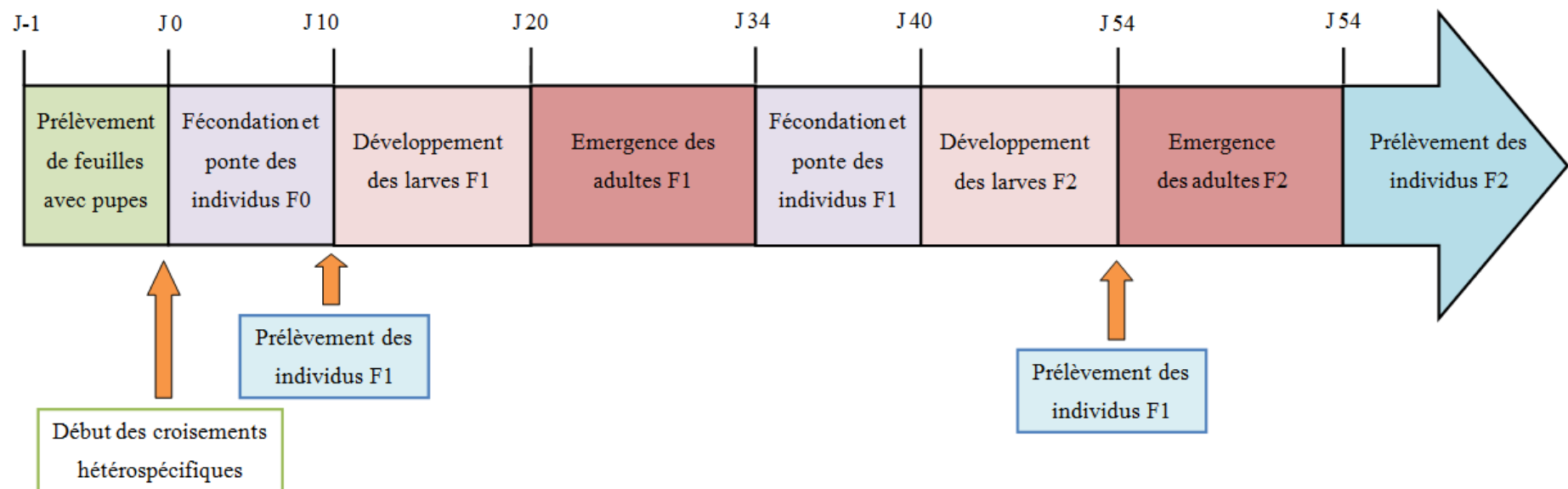


Figure 9 : Déroulement général des manipulations pour la mise en place des croisements et les récoltes des insectes.

crochet au niveau de l'appareil reproducteur, cet organe correspond au pénis (Ghanim et *al.*, 2001) (Figure 7). Une fois le sexe des adultes déterminé, les croisements sont mis en place. Des cages de 20x20x20 cm sont utilisées dans lesquelles sont rajoutés des plants de cotons d'environ 20 jours (Figure 8). Après avoir séparé les mâles des femelles pour chaque espèce, les individus vierges ont été relâchés dans les cages. Les femelles de l'espèce MEAM1 ont été mises avec des mâles de l'espèce IO et inversement, des mâles MEAM1 seront mis avec des femelles IO. Des cages témoins négatifs seront également effectuées. Ces cages ont été constituées de femelles MEAM1 avec des mâles MEAM1 et inversement, des femelles IO avec des mâles IO. Le stade pupes étant prédatés par les Thrips (Maanen et *al.*, 2012), du Sticky Trap bleu a été ajouté pour chaque pot contenant les plants de coton.

Pour chaque types répliques (cages intra ou interspécifiques) 10 femelles et 10 mâles nouvellement émergés ont été placés sur les plants de cotons à l'intérieur des cages. Les cages ont été ensuite placées dans une salle climatique 25°C avec une humidité relative d'environ 60% et d'une photopériode de 12h : 12h. Au total, 86 cages de croisements interspécifiques et 12 cages de croisements intraspécifiques (6 cages témoins MEAM1 et 6 cages témoins IO) ont été mises en place.

Dix jours plus tard, les insectes ont récoltés à l'aide d'un aspirateur à bouche et mis dans de l'éthanol à 95° puis stockés à -20°C. Les insectes ont été par la suite sexés et une PCR a été effectuée afin de vérifier leur identité (espèce MEAM 1 ou IO) (Figure 9). 30 jours plus tard (temps estimé pour que la descendance se soit développée en adultes et que le femelles aient eu le temps de pondre), la première génération a été récoltée à l'aide d'un aspirateur à bouche et mis tout de suite dans de l'éthanol à 95°C puis stockés à -20°C. Les insectes ont été ensuite comptés et sexés à la loupe binoculaire (40×). 30 jours ont encore été laissés pour l'obtention des adultes F2 puis récoltés pour être comptés et sexés.

Par rapport au planning initial pour les récoltes des insectes, le laps de temps a été augmenté pour laisser du temps aux femelles de pondre. De même, durant le stage, les F3 devaient également être analysées, or il n'y en pas eu. On s'est donc centré sur les F0, F1 et F2.

2.1 Etude de la diversité nucléaire et endosymbiotique

2.1.1 *Extraction d'ADN*

Après le sexage des aleurodes, les insectes sont placés individuellement dans des puits de plaques PCR contenant 25 µl d'une solution d'extraction contenant de la protéinase K (facilitant la lyse de la chitine) (Annexe 3). La plaque est ensuite recouverte d'une feuille d'aluminium collante puis mise dans une étuve à 37°C toute une nuit. Le lendemain, la protéinase K est inactivée à 90°C pendant 10 minutes. Un volume de 35µl d'eau HPLC (CHROMASOLV, Sigma-Aldrich) est ajouté à l'ADN extrait. La plaque d'ADN est ensuite stockée à -20°C.

2.1.2 *Diversité nucléaire*

Amplification des microsatellites et génotypage

Un premier crible des populations a été réalisé sur les femelles de génération F1 (vrai hybrides). Ce criblage a été fait grâce au marqueur MS 145 qui a des gammes de tailles d'allèles spécifiques de chaque espèce (pour MEAM1 les tailles s'échelonnent entre 210 et 250, pour l'espèce IO entre 170 et 190). Ainsi il est très facile de vérifier nos croisements pour de potentielles contaminations à ce stade. Ce même criblage a été aussi passé sur les individus de Fo que nous avons pu récupérer.

Dans un second temps, la diversité allélique a été testée sur les adultes F0 et leur descendance en utilisant 10 marqueurs microsatellites marqués par un fluorochrome agencés en 2 multiplexes PCR : P7, P62, P53, P41, P32, P5, P11, P59, Bem25 et Ms145 (De Barro 2005 ; Delatte et *al.*, 2006 ; Dalmon et *al.*, 2008) (pour les détails du mix et des programmes PCR se référer à l'Annexe 5). Les produits PCR ont été visualisés grâce à un génotypeur (3130xl Genetic analyser) et analysés à l'aide du logiciel GeneMapper v4.0.

2.1.1 *Diversité endosymbiotique*

Détection des endosymbiotes

La détection des endosymbiotes se fait selon les étapes synthétisées en figure 9.

Dans un premier temps, une PCR multiplexe a été effectuée pour détecter la présence des endosymbiotes secondaires. La présence de quatre endosymbiotes a été testée avec des amorces marquées qui ciblent de façon spécifique *Cardinium* (C), *Hamiltonella* (H),

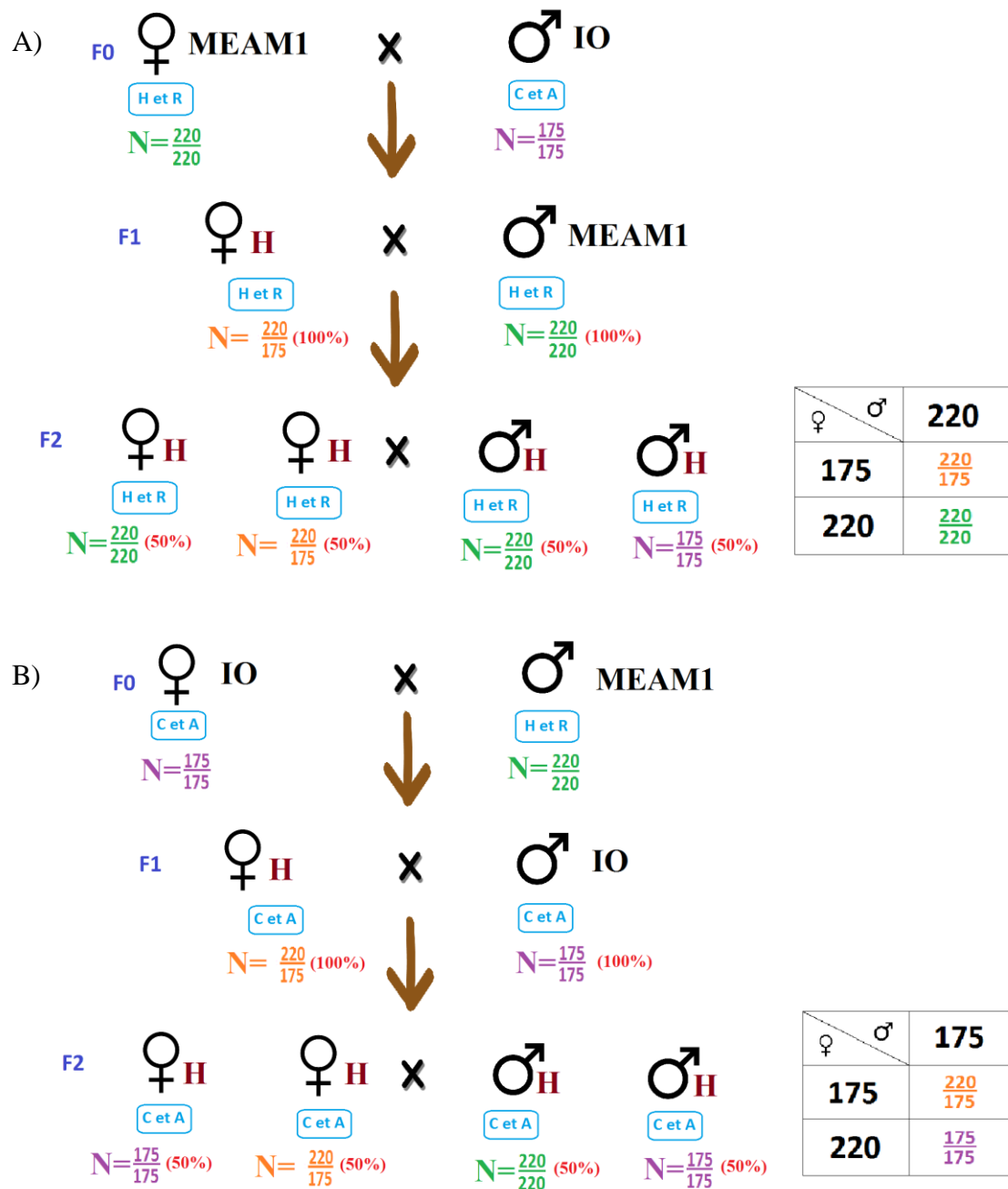


Figure 10 : Schéma de croisements entre espèces MEAM1 et IO.

A) Les femelles de l'espèce MEAM1 croisées avec les mâles de l'espèce IO. B) Les femelles de l'espèce IO croisées avec les mâles de l'espèce MEAM1.

H : *Hamiltonella* ; R : *Rickettsia* ; C : *Cardinium* ; A : *Arsenophonus*. N correspond aux tailles des allèles discriminant (220 pb et 175 pb) détecté à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires.

Rickettsia (R) et *Arsenophonus* (A) (annexe6). Cette PCR multiplexe permet de repérer une éventuelle contamination dans les croisements en F0 et dans leur descendance (contrairement à l'amorce Ms145 qui permet de le vérifier en F0 et F1 uniquement). Les produits PCR ont également été passés au génotypeur (3130xl Genetic analyser) et les résultats ont été par la suite lus à l'aide du logiciel GeneMapper v4.0.

Lorsque le cortège d'un individu est composé des deux endosymbiotes attendus pour son espèce (H et R pour l'espèce MEAM1 ; C et A pour l'espèce IO), le résultat de cette analyse sera considérée comme valide. Lorsque les résultats sont différents de celui-ci, une absence de détection doit être vérifiée.

En effet, lorsqu'un seul endosymbiote secondaire est détecté sur les deux attendus pour son espèce, l'échantillon est de nouveau testé. Une PCR simplexe comprenant le couple d'amorces spécifiques de l'endosymbiote non détecté est effectuée. Ainsi, un individu testé positif sera considéré comme porteur des deux endosymbiotes. Dans le cas contraire, l'individu sera considéré comme porteur d'un seul endosymbiote.

De même, lorsqu'aucun endosymbiote n'est détecté, l'individu est de nouveau testé avec une PCR duplexe composé des deux couples d'amorces spécifiques des endosymbiotes attendus pour son espèce. Le résultat négatif de cette PCR sera conservé si et seulement si l'individu se révèle positif à la PCR simplexe ciblée sur un gène de l'endosymbiote primaire obligatoire *Portiera sp.*

Lorsque qu'il n'y a pas de signal après les PCR de vérification, la qualité de l'ADN bactérienne est vérifiée en utilisant les amorces PortF/PortR pour la PCR de détection de l'endosymbiote primaire *Portiera aleyridudarum* (Annexe 7). Ainsi, un individu ne présentant aucune amplification pour l'endosymbiote sera exclu de l'étude.

2.1.1 **Analyse des données**

Analyses des effectifs obtenus après les croisements

Les analyses statistiques ont été traitées avec le logiciel R v.3.0.1 (R Core Team 2013).

Le nombre de femelle produit en F1 dans les différents croisements inter- et intraspécifiques ont été analysés en utilisant une analyse de variance (ANOVA). Un test de Tukey SHD a été par la suite utilisé lorsque l'analyse de variance présentait une différence significative

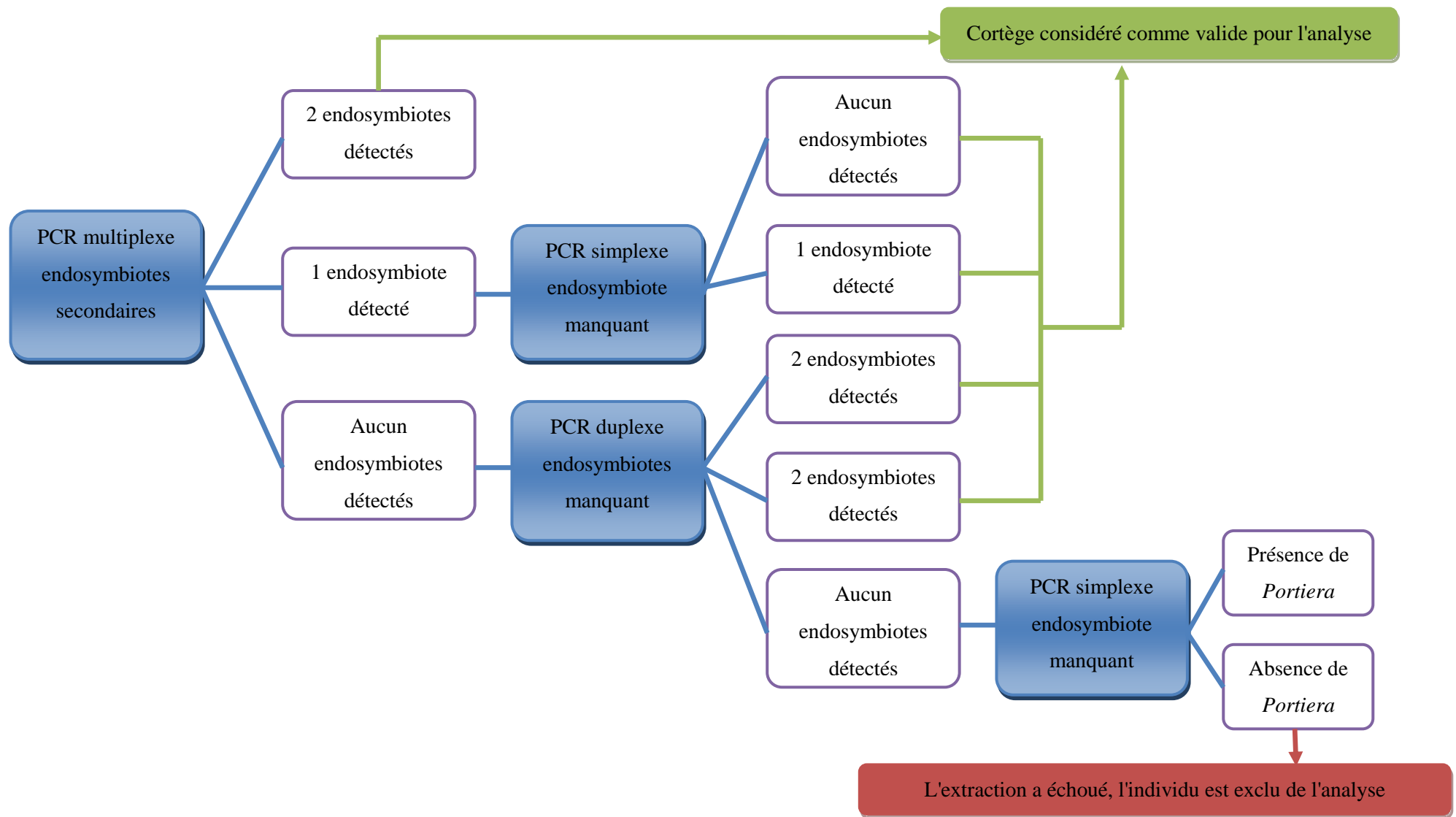


Figure 11 : Organigramme du protocole à suivre pour la mise en évidence des endosymbiotes chez *B. tabaci*. . * Au préalable nous avons testé les populations de nos élevages et seul 2 endosymbiotes au maximum sont présent par espèce

(P-val <0,05). afin de voir s'il y avait une différence d'effectif dans les quatre types de croisements, une comparaison de moyenne deux à deux.

Analyses des microsatellites et de la diversité génétique

Pour déterminer la structure de la population obtenue après les croisements, une analyse multivariée a été effectuée en utilisant l'analyse discriminante par composante principale (DAPC) pour assigner les individus à des groupes génétiques. Le principe de la DAPC est d'optimiser la variabilité entre les groupes, en minimisant la variabilité à l'intérieur des groupes. Elle présente l'avantage de ne pas faire d'hypothèse sur les populations.

Analyse de la communauté endosymbiotique

La distribution des combinaisons endosymbiotiques dans les populations hybrides a été analysée en comparant la fréquence de l'infection attendue des hybrides en fonction de l'infection observée chez les populations maternelles MEAM1 et IO. Une loi binomiale exacte a été utilisée pour comparer l'infection attendue et observée.

Afin de voir si le cortège endosymbiotique global est le même pour les parents ayant une descendance hybride par rapport à ceux qui n'en n'ont pas, un test de Fischer à été utilisé. De même, pour voir quel cortège domine dans les deux types de descendances (hybrides ou non), un test de Fisher a été effectué pour chaque cortège endosymbiotique.

3 Résultats

3.1 Croisements intra et interspécifique

Un total de 86 cages a été mis en place pour les croisements interspécifiques durant ce stage, soit 43 cages (dont 13 étaient contaminées) pour les croisements de type ♂MEAM1 x ♀IO et 43 cages (dont 9 étaient contaminées) pour les croisements de type ♀MEAM1 x ♂IO. Le nombre de cages pour lesquelles il y a eu des femelles hybrides était de 19 (avec 4 cages contaminées) pour les croisements de type ♂MEAM1 x ♀IO et de 17 cages (avec 4 cages contaminées) pour les croisements de type ♀MEAM1 x ♂IO (Tableau 4). Le pourcentage de succès en F1 pour les croisements ♂MEAM1 x ♀IO et ♀MEAM1 x ♂IO était de 39,53% et 34,88% respectivement. En F2, 14 cages ont données une descendance hybride pour les croisements de types ♂MEAM1 x ♀IO, soit 32,26% de succès. Pour les croisements de types ♀MEAM1 x ♂IO, les 19 cages de la F2 ont toutes données des hybrides, soit un succès de 34,88% (Tableau 4).

Tableau 4 : Nombre de cages qui a donné une descendance hybride en F1 et F2 avec le nombre de cages mis en place pour les croisements ♂MEAM1 x ♀IO et ♀MEAM1 x ♂IO. Le pourcentage est calculé par rapport au nombre de cages mis en place pour les deux types de

	Cages mises en place pour l'étude	Cages pour lesquelles il y a une F1 hybride	Cages pour lesquelles il y a une F2 hybride
♂MEAM1 x ♀IO	43 (13)	17(4) *	14 (4)
♀ MEAM1 x ♂ IO	43 (9)	19 (4)	19(4)

croisements.

Tableau 5 : Nombre de cages témoins et croisements interspécifiques mis en place avec les effectifs pour chaque génération et le sexe.

	Cages témoins mises en place	F1 récupérées		F2 récupérées	
♂IO x ♀IO	6	♀ 31	♂ 21	♀ 86	♂ 118
♂MEAM1 x ♀MEAM1	6	290	214	795	922
	Cages avec hybrides F1 et F2	F1 récupérées		F2 récupérées	
	17	<i>femelles</i>	<i>mâles</i>	<i>femelles</i>	<i>mâles</i>
♂MEAM1 x ♀IO		37	413	6	22
♀MEAM1 x ♂IO	19	11	923	12	90

*♀:femelle, ♂:mâle

On observe une différence significative entre le nombre de femelles produite par croisements inetr- ou intraspécifiques (ANOVA, P-val < 0,05) (tableau 4). Lorsque les moyennes des effectifs par cages des quatre types de croisements sont comparées deux à deux, il n'y a pas de différence significative entre les deux types de croisements interspécifiques ($\text{♀MEAM1} \times \text{♂IO}$ et $\text{♂MEAM1} \times \text{♀IO}$, test de Tukey SHD, P-val > 0,05). De même, il n'y a pas de différence significative entre les croisements : témoins IO et ♀MEAM1 (test de Tukey SHD, P-val > 0,05). Toutefois, il y a une différence significative entre les croisements : témoins MEAM1 et $\text{♀MEAM1} \times \text{♂IO}$, témoin MEAM1 et $\text{♂MEAM1} \times \text{♀IO}$, témoins MEAM1 et IO (test de Tukey SHD, P-val > 0,001).

Les résultats qui suivent ont été obtenus à partir des individus récoltés en F0. Or sur 86 cages de départ (avec 20 individus par cage), seulement 186 individus ont été récupérés sur 1720, soit un pourcentage de perte de 89%.

3.2 Structure génétique des populations

Une première DAPC a été effectuée sur les populations de F0 MEAM1, IO et leurs hybrides F1 (Figure9 A). On observe la présence de trois groupes génétiques sur l'axe des abscisses. C'est l'axe des abscisses qui contribue le plus à la séparation en groupe génétique distinct. Le premier groupe avec les coordonnées négative [0,-1] sur l'axe des abscisses est composé d'individus IO F0. Le second groupe avec les coordonnées positives [0,1] est constitué d'individus MEAM1. Les deux derniers groupes sont composés d'individus hybrides. En bleu ce sont les hybrides de première génération et en rose ce sont les hybrides de seconde génération. Le groupe de population hybride en F1 est situé entre les groupes MEAM et IO. Les individus du groupe de population F2 se situent au centre mais éclatés entre les populations MEAM1 et IO. On a des individus qui sont plus du côté MEAM1 et les autres du côté IO.

3.1 Communauté endosymbiotique secondaire

3.1.1 Répartition du cortège endosymbiotique

La PCR pour la caractérisation des quatre endosymbiotes secondaires a été réalisée sur 156 individus en F0 (101 pour les croisements $\text{♀MEAM1} \times \text{♂IO}$ et 29 pour les croisements $\text{♂MEAM1} \times \text{♀IO}$), 47 en F1 (10 pour les croisements $\text{♀MEAM1} \times \text{♂IO}$ et 37 pour les croisements $\text{♂MEAM1} \times \text{♀IO}$) et 130 en F2 (101 pour les croisements $\text{♀MEAM1} \times \text{♂IO}$ et 29 pour les croisements $\text{♂MEAM1} \times \text{♀IO}$).

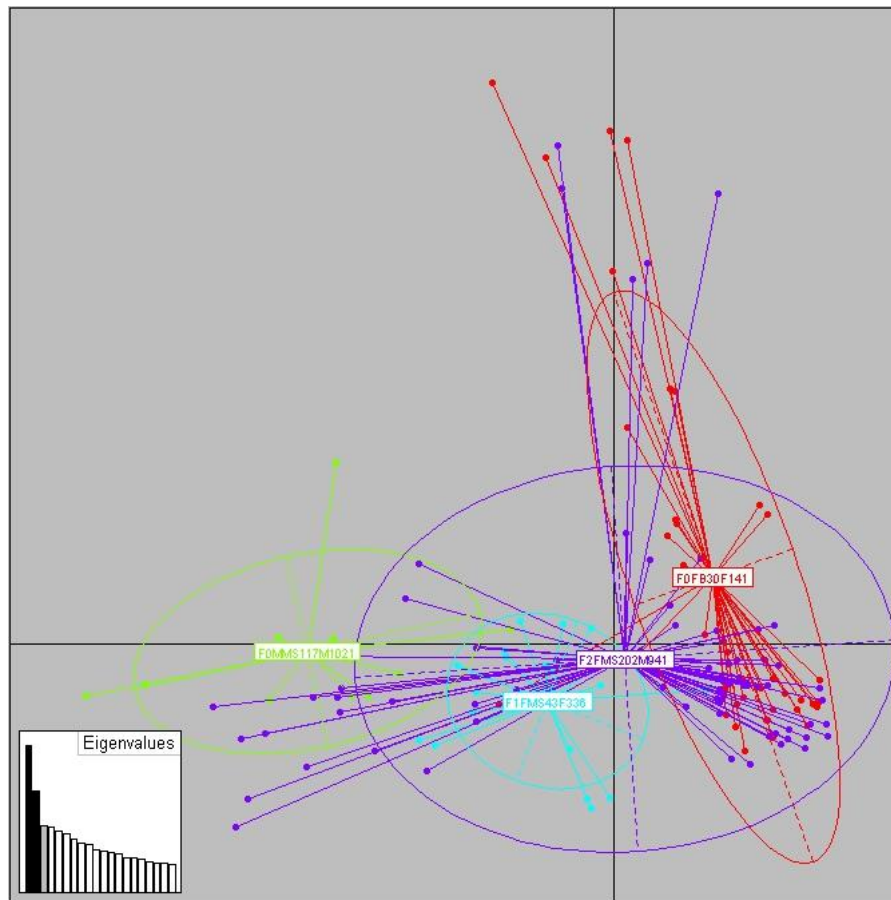


Figure 12 : Analyse multivariée discriminante par composante principale de la population *B. tabaci* obtenue après les croisements.

Vert : Population IO ; Rouge : population MEAM1 ; Bleu: population hybride F1 ; Violet : population hybride F2

Les différences dans les combinaisons endosymbiotiques ont été analysées (Annexe 8). Dans les croisements F0 pour les croisements ♂MEAM1 x ♀IO, environ la moitié des individus femelles possèdent *Cardinium* et *Arsenophonus* (51,1%). Les individus restant sont soit infectés par *Cardinium* (27,7%) ou *Arsenophonus* (4,3%) ou aucun endosymbiote secondaire détecté (17%). Pour les mères MEAM1, 65% des individus portent *Rickettsia* contre 1,6% pour *Arsenophonus*, 23,3% en co-infection *Rickettsia/Hamiltonella* et 10% pour les individus où les endosymbiotes n'ont pas été détectés.

Lorsque l'on regarde les fréquences attendues et observées pour la descendance hybride **des** croisements issus de mères IO, la fréquence observée pour la co-infection *Cardinium/Hamiltonella* est inférieure à celle attendue. A l'inverse, la fréquence pour *Cardinium* est supérieure à celle attendue. De même pour les hybrides n'ayant pas d'endosymbiotes secondaires détectés.

Pour les croisements issus de mères MEAM1, la fréquence attendue pour la co-infection *Hamiltonella/Rickettsia* est supérieure à celle attendue. De plus, la fréquence observée des individus dont les endosymbiotes n'ont pas été détecté est inférieur à celle qui était attendue.

Comme la fréquence observée est très différente de celle attendue pour le *Cardinium*, les cages où il a été retrouvé de nombreuses femelles hybrides en F1 (≥ 5) ont été sélectionnées pour tester pour chacune de ces cages les fréquences attendues et observées (Figure13). On observe une diminution significative de la fréquence observée par rapport à l'attendue pour la bi-infection *Cardinium /Arsenophonus*, alors qu'on observe une augmentation significative de la fréquence observée par rapport à l'attendue pour la mono infection *Cardinium* pour les croisements 2, 3 et 4 de la figure 13. Pour le croisement 1,

3.1.1 Comparaison du cortège endosymbiotique des parents ayant une descendance hybride ou non.

Afin de voir si le cortège endosymbiotique est le même pour les parents ayant une descendance hybride par rapport à ceux qui n'en n'ont pas, un test de Fischer à été utilisé. La répartition globale du cortège endosymbiotique des parents n'est pas la même pour les parents ayant une descendance hybrides ou non (test de Fisher, P-value <0.05)

Le cortège endosymbiotique entre les deux populations ayant une descendance hybride ou non à été par la suite testé un à un (Tableau 6). La proportion entre les populations ayant une

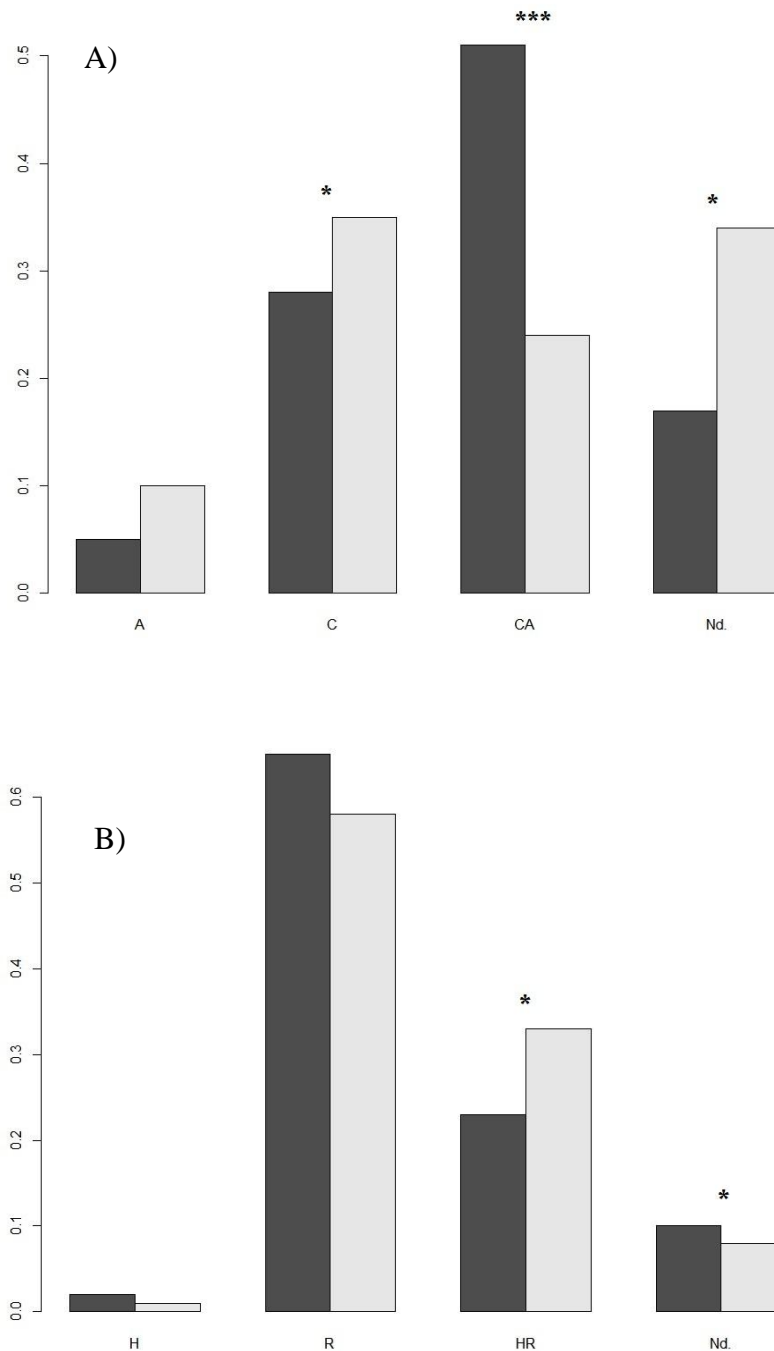


Figure 13 : Histogramme des fréquences des combinaisons endosymbiotiques pour les croisements de type ♂MEAM1 x ♀IO et ♀MEAM1 x ♂IO. A) Hybrides hébergeant le symbiotype parental IO. B) Hybrides hébergent le symbiotype parental MEAM1. Les barres noires correspondent aux effectifs attendus, les barres grises aux effectifs observés. H : *Hamiltonella* ; R : *Rickettsia* ; HR : *Hamiltonella/Rickettsia* ; Nd. : endosymbiote secondaires non détecté. *P < 0.05 et ***P < 0.001 : différences significatives entre les effectifs attendus et observés effectuées à l'aide d'un test binomiale.

descendance hybride ou non est significativement différente pour le cortège H et pour les individus où il n'y a pas d'endosymbiote secondaire détecté (Nd.).

4 Discussion

Lors de cette étude, nous avons obtenus en conditions contrôlées des hybrides de premières et de seconde génération à partir de croisements interspécifiques (MEAM1-IO). De plus, nous avons constaté pour les croisements issus de femelles IO que le cortège endosymbiotique différait en F1 par rapport aux F0, supposant une perte d'*Arsenophonus*.

4.1 Obtention d'une descendance hybride

Une descendance pour les croisements interspécifiques a été obtenue dans 35% des cas. Ces pourcentages de succès obtenus en F1 montrent qu'il y a des croisements ayant donné une descendance hybride. Les pourcentages de succès obtenus en F1 montrent qu'il y a sensiblement des chances d'avoir des croisements ayant donné une descendance hybride.

Les comparaisons des effectifs obtenus entre les croisements témoins MEAM1 et les témoins IO montrent qu'il y a une production de femelles plus importante pour l'espèce MEAM1 que pour l'espèce IO. De même, la production de femelles est plus importante pour les croisements témoins B que pour les croisements de types ♂MEAM1 x ♀IO et ♀MEAM1 x ♂IO. Cela montre que l'espèce MEAM1 est plus compétitive que l'espèce IO. Des résultats similaires montrent que l'espèce MEAM est plus compétitive que les espèces indigènes à une région (De Barro and Hart, 2000 ; Wang et al., 2011). Les individus MEAM1 ont un temps de développement plus court, des œufs plus gros, les adultes sont plus grands et possèdent une plus grande fécondité (Delatte et al., 2009). De plus, il a souvent été décrit que l'espèce MEAM1 taux d'accouplement supérieur à celui de l'espèce IO (Liu et al., 2007 ; Wang et al., 2012), ce qui pourrait expliquer que l'on ait une différence dans le nombre de descendants femelles en F1 entre les deux croisements témoins.

Lorsque l'on compare le nombre de descendants obtenu pour les deux types de croisements interspécifiques, il n'y a pas de différence significative entre le nombre de descendants femelles hybrides obtenu. De plus, lorsque l'on compare les croisements témoins MEAM1 aux deux types de croisements, il y a une différence significative pour le nombre de descendants femelles. Les données obtenues montrent qu'il y a une isolation partielle pour les deux types de croisements, puisque l'on obtient une descendance hybride en F1 et F2 mais en

Tableau 6 : Répartition de chaque cortège endosymbiotique en fonction des parents ayant une descendance hybride ou non.

H : *Hamiltonella* ; R : *Rickettsia* ; HR : *Hamiltonella/Rickettsia* ; Nd. : endosymbiote non détecté ; DH : Descendance hybride.

	C	A	CA	P	H	R	HR
Effectifs des parents avec DH	13 (a)	2 (a)	24 (a)	11 (a)	3 (a)	9 (a)	11 (a)
Effectifs des parents sans DH	10 (a)	0 (a)	10 (a)	0 (b)	0 (a)	12 (b)	4 (a)

Les analyses statistiques (test de Fisher) pour les endosymbiotes entre les deux populations sont indiquées avec des lettres. Les effectifs avec des lettres qui diffèrent sont significativement différentes (P-val <0,05)

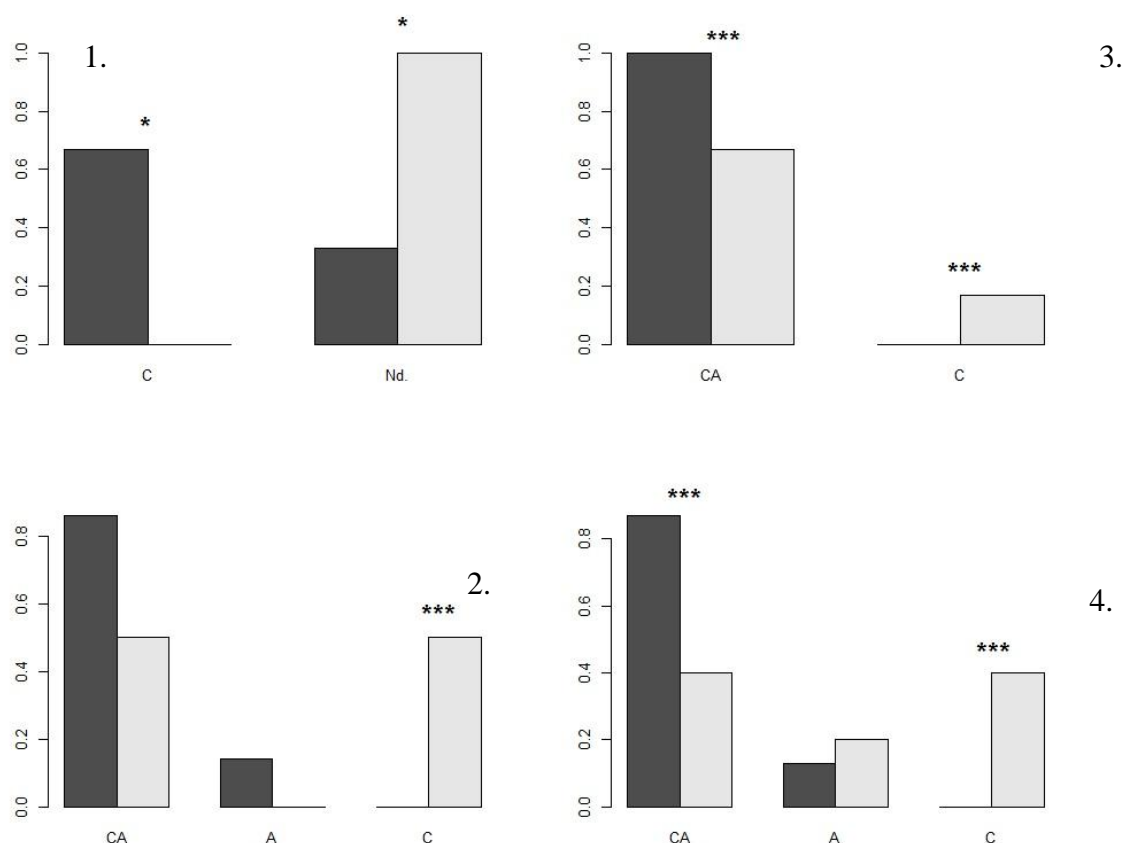


Figure 14 : Fréquences des combianaisons endosymbiotiques attendues (barres noires) et observées (barres grises) dans les descendances pour quatre croisements de type ♂MEAM1 x ♀IO

faible quantité. Par ailleurs, aucune descendance F3 n'a été obtenue n'a été obtenue parmi les cages ou les croisements ont fonctionné. Il y a une nette baisse de la valeur sélective, qui montre qu'il y a bien un isolement reproducteur. Ces observations corroborent avec d'autres études sur les croisements interspécifiques chez *B. tabaci* (De Barro and Hart, 2000 ; Wang et al., 2011 ; Luan and Liu, 2012). Cet isolement peut-être de nature pré-zygotique. Il peut être dû à une barrière au niveau du comportement de court ou pré-copulatoire. Plusieurs études de croisements entre espèces putatives ont permis de mettre en avant cette hypothèse (Liu et al., 2007, Xu et al., 2010; Sun et al., 2011). Ces isolements pré-zygotiques ont été également mis en avant pour d'autres modèles biologiques, comme chez la drosophile où la féminisation spécifique des tissus des mâles réduit leur performance au comportement de court.

4.2 Diversité endosymbiotique chez les hybrides

Dans les populations obtenues après croisements, nous avons retrouvé les endosymbiotes secondaires attendus. En plus de l'endosymbiote primaire *Portiera aleyrodidarum*, les quatre endosymbiotes secondaires attendus ont été détecté : *Hamiltonella*, *Rickettsia*, *Arsenophonus* et *Cardinium*. De plus, la communauté symbiotique pour les espèces MEAM1 et IO correspondent bien à celles définie par l'étude de Thierry et al. (2011), c'est-à-dire *Hamiltonella* et *Rickettsia* pour les espèces MEAM1 et *Arsenophonus* et *Cardinium* pour l'espèce IO.

La majorité des individus de la population IO sont co-infecté par *Arsenophonus* et *Cardinium* en F0, résultat corroboré avec l'étude Thierry et al., (2011), alors que pour l'espèce MEAM1 la majorité est infecté par *Rickettsia*, résultat non retrouvé dans la même étude. Les résultats pour le cortège endosymbiotique, notamment pour les hybrides F1 issus de femelles B, peut être biaisés par le fait que le pourcentage de récupération des F0 est faible (11%), ce qui pourrait expliquer qu'on ai une différence entre nos résultats et ceux de l'étude de Thierry et al. (2011).

Les hybrides pour les croisements issus de femelles IO possèdent un cortège endosymbiotique différent de celui attendu. En effet, pour la bi-infection *Arsenophonus/Cardinium*, le pourcentage observé (24%) est inférieur à celui attendu (51%). Ce résultat est également retrouvé dans l'étude de Thierry et al. (2011). Ces résultats ont été obtenus en prenant en compte la globalité des cages ayant une descendance hybride. Lorsque l'on s'est intéressé au cortège endosymbiotique qu'on pouvait retrouver cage par cage, on a constaté qu'il le taux de

bi-infection *Arsenophonus/Cardinium* diminuait par rapport à ce qui été attendu. On peut donc supposer qu'il y peut y avoir perte d'*Arsenophonus* ou qu'un faible nombre d'individus hybride viable héberge *Arsenophonus*. Par ailleurs, dans l'étude de Pol (2013), il a été mis en avant que le cortège maternel bi-infectieux est transmis dans une proportion de 59% pour l'espèce IO, avec possibilité de perte de la bi-infection.

La comparaison entre le cortège endosymbiotique des parents ayant une descendance hybride aux parents n'ayant sans descendance hybrides donne *Rickettsia* comme endosymbiote qui dèrent chez les deux populations. On ne pas conclure sur résultat car le pourcentage de récupération des F0 étant faibles,

4.3 Structure génétique

L'analyse de la structure génétique de la population dans les croisements mis en place confirme les études de Delatte et *al.* (2006) et Thierry et *al.* (2011) c'est à dire la présence d'hybrides. De plus, l'analyse discriminante par composante principale effectuée donne le même profil que l'analyse multivariée de Thierry et *al.* (2011). Les populations MEAM1 et IO sont bien séparés l'un de l'autre, et la population hybride situé entre les populations parents. La nouveauté apportée par cette étude est la distinction entre l'hybride de première génération et de seconde génération. En effet, grâce à cette distinction, on peut voir que les hybrides en F2 ont soit un profil plus du côté MEAM1 ou soit un profil plus IO. *B. tabaci* est une espèce haplo-diploïdes, dont la descendance mâle (haploïde) est produit par la non fécondation des œufs et la descendance femelle est produit par la fécondation des œufs, ce qui indique un succès d'accouplement et de la fécondation des œufs (Byrne and Bellows Jr, 1991; Ruan et al., 2007). Comme les femelles hybrides se croisent avec leurs frères (issus d'œufs non fécondé de la même mère), cela peut expliquer

La diversité allélique n'a pas pu être déterminée à cause du faible effectif obtenue lors de la récolte des individus. Il n'était pas possible d'interpréter les résultats.

5 Conclusion et perspectives

Concernant l'objectif principal de cette étude, on peut conclure qu'il est possible d'obtenir une descendance hybride jusqu'à la F2 avec un pourcentage de 39,53% en F1 et 32,26% en F2 pour les croisements de type ♀MEAM1 x ♂IO et 34,88 pour la f1 et F2 pour ♂MEAM1 x ♀IO. Mais on observe qu'il y a une très forte baisse de valeur de la valeur sélective. On peut

également conclure que le cortège endosymbiotique est différent en F1 par rapport aux mères de l'espèce IO, Prévalence de CA en F1 et C en F2, ce qui suggère la perte de l'endosymbiote *Arsenophonus*.

Il aurait été intéressant d'étudier l'interaction entre le fond nucléaire et endosymbiotique pour voir s'il y a une interaction ou si c'est une incompatibilité de type Dobzhansky-Muller. Pour cela, il aurait fallu étudier l'association locus par locus et allèle par allèle pour chaque combinaison endosymbiotique chez les individus parents MEAM1 et IO d'un côté et hybrides de l'autre.

Ayant des problèmes dans les effectifs en F0, il faudrait récolter les parents non plus au bout de 10 jours mais 5 jours par exemple pour essayer d'augmenter les effectifs de travailler par la suite sur la diversité allélique et endosymbiotique. De plus, il serait intéressant d'effectuer des croisements inverse au backcross, c'est-à-dire prendre les femelles hybrides et les croisées avec des mâles d'une autre espèce au lieu de ses frère pour avoir une idée de la possibilité d'introggression des fonds génétiques.

Bibliographies

- Bateson, W., 1922. Evolutionary faith and modern doubts. *Science* 55, 55–61.
- Baumann, P., 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu Rev Microbiol* 59, 155–189.
- Baumann, P., Moran, N.A., Baumann, L., Dworkin, M., 2006. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The prokaryotes* 1, 403–438.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C., Markham, P.G., 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125, 311–325.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155.
- Bing, X.-L., Ruan, Y.-M., Rao, Q., Wang, X.-W., Liu, S.-S., 2013. Diversity of secondary endosymbionts among different putative species of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Sci.* 20, 194–206.
- Bourriquet, G., 1938. Note concernant les maladies des plantes cultivées à La Réunion. *Rev. Agric. La Réunion.* 43, 33–38.
- Boykin, L.M., Shatters, R.G., Rosell, R.C., McKenzie, C.L., Bagnall, R.A., De Barro, P., Frohlich, D.R., 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 1306–1319.
- Broadbent, 1989. Sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), a potential insect pest in Canada. *Can. Entomol.* 121, 1027–1028.
- Brumin, M., Kontsedalov, S., Ghanim, M., 2011. *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Sci.* 18, 57–66.

- Buchner, P., 1965. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. New York, N.Y.
- Byrne, D.N., Bellows Jr, T.S., 1991. Whitefly biology. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 431–457.
- Byrne, F.J., Cahill, M., Denholm, I., Devonshire, A.L., 1995. Biochemical identification of interbreeding between B-type and non B-type strains of the tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. *Biochem. Genet.* 33, 13–23.
- Cheek, S., Macdonald, O., 1994. Statutory controls to prevent the establishment of *Bemisia tabaci* in the United Kingdom. *Pestic Sci* 42, 135–142.
- Chiel, E., Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Inbar, M., Ghanim, M., 2007. Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bull. Entomol. Res.* 97, 407–413.
- Clark, E.L., Karley, A.J., Hubbard, S.F., 2010. Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? *Protoplasma* 244, 25–51.
- Costa, H.S., Brown, J.K., 1991. Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. *Entomol. Exp. Appl.* 61, 211–219.
- Costa, H.S., Brown, J.K., Sivasubramanian, S., Bird, J., 1993. Regional distribution, insecticide resistance, and reciprocal crosses between the A and B biotypes of *Bemisia tabaci*. *Insect Sci. Its Appl.* 14, 255.
- Coyne, J.A., Orr, H.A., 2004. Speciation. Sinauer Associates Sunderland, MA.
- Czosnek, H., Laterrot, H., 1997. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch. Virol.* 142, 1391–1406.
- Darwin, C., 1859. On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favored races in the struggle for life. London.
- De Barro, P.J., 2005. Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 14, 3695–3718.

- De Barro, P.J., Driver, F., 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.* 36, 149–152.
- De Barro, P.J., Hart, P.J., 2000. Mating interactions between two biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res.* 90, 103–112.
- De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., Dinsdale, A.B., 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 1–19.
- De Vrie, H., 1906. *Species and varieties, their origin by mutation*. Open Court Publishing Co, Chicago IL.
- Delatte, H., David, P., Granier, M., Lett, J.M., Goldbach, R., Peterschmitt, M., Reynaud, B., 2006. Microsatellites reveal extensive geographical, ecological and genetic contacts between invasive and indigenous whitefly biotypes in an insular environment. *Genet. Res.* 87, 109–124.
- Delatte, H., Duyck, P.-F., Triboire, A., David, P., Becker, N., Bonato, O., Reynaud, B., 2009. Differential invasion success among biotypes: case of *Bemisia tabaci*. *Biol. Invasions* 11, 1059–1070.
- Delatte, H., Holota, H., Warren, B.H., Becker, N., Thierry, M., Reynaud, B., 2011. Genetic diversity, geographical range and origin of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Indian Ocean Ms. *Bull. Entomol. Res.* 101, 487.
- Delatte, H., Reynaud, B., Granier, M., Thornary, L., Lett, J.M., Goldbach, R., Peterschmitt, M., 2005. A new silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. *Bull. Entomol. Res.* 95, 29–35.
- Dobzhansky, T., 1935. A critique of the species concept. *Philosophy Sci.* 2, 344–355.
- Dobzhansky, T., 1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia Univ. Press.

- Drès, M., Mallet, J., 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357, 471–492.
- Engelstädter, J., Telschow, A., 2009. Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity* 103, 196–207.
- Feldhaar, H., 2011. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* 36, 533–543.
- Fishpool, L.D.C., Burban, C., 1994. *Bemisia tabaci*: the whitefly vector of African cassava mosaic geminivirus. *Trop. Sci.* 34, 55–72.
- Frohlich, D.R., Torres-Jerez, I., Bedford, I.D., Markham, P.G., Brown, J.K., 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.* 8, 1683–1691.
- Gawel, N.J., Bartlett, A.C., 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.* 2, 33–38.
- Gennadius, P., 1889. Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. *Ellenike Ga.* 5, 1–3.
- Gerling, D., 2002. Una reinterpretación sobre las moscas blancas¹. *Manejo Integrado Plagas* 63, 13–21.
- Gerling, D., Horowitz, A.R., Baumgaertner, J., 1986. Autecology of *Bemisia tabaci*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 17, 5–19.
- Ghanim, M., Rosell, R.C., Campbell, L.R., Czosnek, H., Brown, J.K., Ullman, D.E., 2001. Digestive, salivary, and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae) B type. *J. Morphol.* 248, 22–40.
- Gottlieb, Y., Ghanim, M., Chiel, E., Gerling, D., Portnoy, V., Steinberg, S., Tzuri, G., Horowitz, A.R., Belausov, E., Mozes-Daube, N., 2006. Identification and Localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3646–3652.

- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljic, M., Brumin, M., Sobol, I., Czosnek, H., Vavre, F., Fleury, F., 2010. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *J. Virol.* 84, 9310–9317.
- Hawthorne, D.J., Via, S., 2001. Genetic linkage of ecological specialization and reproductive isolation in pea aphids. *Nature* 412, 904–907.
- Himler, A.G., Adachi-Hagimori, T., Bergen, J.E., Kozuch, A., Kelly, S.E., Tabashnik, B.E., Chiel, E., Duckworth, V.E., Dennehy, T.J., Zchori-Fein, E., 2011. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science* 332, 254–256.
- Howard, D.J., 1999. Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30, 109–132.
- Irwin, D.E., 2000. Song variation in an avian ring species. *Evolution* 54, 998–1010.
- Jones, D.R., 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 195–219.
- Kazazian, H.H., 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626–1632.
- Kontsedalov, S., Zchori-Fein, E., Chiel, E., Gottlieb, Y., Inbar, M., Ghanim, M., 2008. The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest Manag. Sci.* 64, 789–792.
- Lane, R., 1977. The species concept in blood-sucking vectors of human diseases. Claridge, M. F., Dawah, H. A., Wilson, M. R. *Syst. Assoc. Spec. Vol. Ser. Species Units Biodivers.* 54, 173–289.
- Liu, H.Y., Cohen, S., Duffus, J.E., 1992. The use of isozyme patterns to distinguish sweetpotato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes. *Phytoparasitica* 20, 187–194.
- Liu, S.S., De Barro, P.J., Xu, J., Luan, J.-B., Zang, L.-S., Ruan, Y.-M., Wan, F.-H., 2007. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science* 318, 1769–1772.

- Liu, S.-S., De Barro, P.J., Xu, J., Luan, J.-B., Zang, L.-S., Ruan, Y.-M., Wan, F.-H., 2007. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science* 318, 1769–1772.
- Losos, J.B., Glor, R.E., 2003. Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends Ecol. Evol.* 18, 220–227.
- Luan, J.-B., Ruan, Y.-M., Zhang, L., Liu, S.-S., 2008. Pre-copulation intervals, copulation frequencies, and initial progeny sex ratios in two biotypes of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Entomol. Exp. Appl.* 129, 316–324.
- Luziau, R., 1953. Contribution à la prospection phytosanitaire de l'île de La Réunion. *Phytoma* 46, 16–21.
- Martin, J.H., Mound, L.A., 2007. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). *Lista de las moscas blancas del mundo (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae)*. *Zootaxa*. 1–84.
- Maruthi, M.N., Colvin, J., Seal, S., 2001. Mating compatibility, life-history traits, and RAPD-PCR variation in *Bemisia tabaci* associated with the cassava mosaic disease pandemic in East Africa. *Entomol. Exp. Appl.* 99, 13–23.
- Maruthi, M.N., Colvin, J., Thwaites, R.M., Banks, G.K., Gibson, G., Seal, S.E., 2004. Reproductive incompatibility and cytochrome oxidase I gene sequence variability amongst host-adapted and geographically separate *Bemisia tabaci* populations (Hemiptera: Aleyrodidae). *Syst. Entomol.* 29, 560–568.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the Origin of Species: From the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press.
- Moran, N.A., McLaughlin, H.J., Sorek, R., 2009. The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science* 323, 379–382.
- Moran, N.A., Mira, A., 2001. The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome Biol* 2, 1–0054.

- Moran, N.A., Telang, A., 1998. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience* 48, 295–304.
- Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71, 123–134.
- Mound, L.A., 1963. Host-correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Homoptera: Aleyrodidae), in: *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*. Wiley Online Library, pp. 171–180.
- Mound, L.A., Halsey, S.H., 1978. Whitefly of the world. A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. John Wiley and Sons.
- Nirgianaki, A., Banks, G.K., Frohlich, D.R., Veneti, Z., Braig, H.R., Miller, T.A., Bedford, I.D., Markham, P.G., Savakis, C., Bourtzis, K., 2003. Wolbachia infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Curr. Microbiol.* 47, 0093–0101.
- Oliveira, M.R.V., Henneberry, T.J., Anderson, P., 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 20, 709–723.
- Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A., Hunter, M.S., 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1803–1807.
- Omondi, A.B., Obeng-Ofori, D., Kyerematen, R.A., Danquah, E.Y., 2005. Host preference and suitability of some selected crops for two biotypes of *Bemisia tabaci* in Ghana. *Entomol. Exp. Appl.* 115, 393–400.
- Orr, H.A., 1995. The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics* 139, 1805–1813.
- Perring, T.M., 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.* 20, 725–737.
- Perring, T.M., Cooper, A.D., Rodriguez, R.J., Farrar, C.A., Bellows, T.S., 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science* 259, 74–77.

- Peterschmitt, M., Granier, M., Mekdoud, R., Dalmon, A., Gambin, O., Vayssieres, J., Reynaud, B., 1999. First report of tomato yellow leaf curl virus in Réunion Island. *Plant Dis.* 83, 303.
- Podos, J., 2007. Discrimination of geographical song variants by Darwin's finches. *Anim. Behav.* 73, 833–844.
- Presgraves, D.C., 2003. A fine-scale genetic analysis of hybrid incompatibilities in *Drosophila*. *Genetics* 163, 955–972.
- Quaintance, A.L., Baker, A.C., 1914. Classification of the Aleyrodidae Part II. US Department of Agriculture. Technica Series. *Bur. entomol.* 27, 95–109.
- Reynaud, B., Wuster, G., Delatte, H., Soustrade, I., Lett, J., Gambin, O., Peterschmitt, M., 2003. Les maladies à begomovirus chez la tomate dans les départements français d'Outre-Mer. II - Le Tomato yellow leaf curl virus (TYLV) à la Réunion. *Phytoma* 562, 13–17.
- Rice, W.R., 1987. Speciation via habitat specialization: the evolution of reproductive isolation as a correlated character. *Evol. Ecol.* 1, 301–314.
- Rieseberg, L.H., 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16, 351–358.
- Ronda, M., Adán, A., Cifuentes, D., Cenis, J.L., Beitia, F., 1999. Laboratory evidence of interbreeding between biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) present in Spain. Abstracts VII International Plant Virus Epidemiology Symposium, Aguadulce (Almería).
- Rosell, R.C., Bedford, I.D., Frohlich, D.R., Gill, R.J., Brown, J.K., 1997. Analysis of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, pp. 575–889.
- Ruan, Y.-M., Luan, J.-B., Zang, L.-S., Liu, S.-S., 2007. Observing and recording copulation events of whiteflies on plants using a video camera. *Entomol. Exp. Appl.* 124, 229–233.

- Sun, D.B., Xu, J., Luan, J.B., Liu, S.S., 2011. Reproductive incompatibility between the B and Q biotypes of the whitefly *Bemisia tabaci* in China: genetic and behavioural evidence. *Bull. Entomol. Res.* 101, 211.
- Takahashi, R., 1936. Some Aleyrodidae, Aphididae, Coccidae (Homoptera), and Thysanoptera from Micronesia. *Tenthredo Acta Entomol. Takeuchi Entomol. Lab.* 1, 109–120.
- Thao, M.L., Baumann, L., Baumann, P., 2004. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evol. Biol.* 4, 25.
- Thierry, M., Becker, N., Hajri, A., Reynaud, B., Lett, J.-M., Delatte, H., 2011. Symbiont diversity and non-random hybridization among indigenous (Ms) and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci*. *Mol. Ecol.* 20, 2172–2187.
- Van Maanen, R., Broufas, G., Oveja, M.F., Sabelis, M.W., Janssen, A., 2012. Intraguild predation among plant pests: western flower thrips larvae feed on whitefly crawlers. *BioControl* 57, 533–539.
- Vautrin, E., Vavre, F., 2009. Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends Microbiol.* 17, 95–99.
- Wang, P., Crowder, D.W., Liu, S.S., 2012. Roles of mating behavioural interactions and life history traits in the competition between alien and indigenous whiteflies. *Bull. Entomol. Res.* 102, 395–405.
- Weeks, A.R., Stouthamer, R., 2004. Increased fecundity associated with infection by a *Cytophaga*-like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271, S193–S195.
- Wu, C.-I., Ting, C.-T., 2004. Genes and speciation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 114–122.
- Xu, J., De Barro, P.J., Liu, S.S., 2010. Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. *Bull. Entomol. Res.* 100, 359.

- Xue, X., Li, S.-J., Ahmed, M.Z., De Barro, P.J., Ren, S.-X., Qiu, B.-L., 2012. Inactivation of *Wolbachia* reveals its biological roles in whitefly host. *PloS One* 7, e48148.
- Zang, L.-S., Liu, S.-S., 2007. A comparative study on mating behaviour between the B biotype and a non-B biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Zhejiang, China. *J. Insect Behav.* 20, 157–171.
- Zchori-Fein, E., Brown, J.K., 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95, 711–718.

Annexes

ANNEXE 1 : DEGATS CAUSE PAR *B. TABACI*



Figure A1 : Plant de tomate présentant des symptômes du *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV).

ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ADN DE B TABACI

L'ADN des insectes sont directement extraits dans les plaques PCR. Chaque individu est donc déposé dans un puits contenant la solution d'extraction, soit dans un volume de 25µL. La composition de la solution d'extraction est indiquée dans le tableau ci-dessous.

Tableau A1 : Composition de la solution d'extraction et rôles des composants

Composant	Concentration	Propriétés
Tris HCL Tris-base [PH-8]	10mM	Sel : Désorganisation des tissus par différence de potentiel osmotique
KCL	50mM	
Tween ® 20	0.45%	Détergents : dissous les structures membranaires
Nonidet ® P-40	0.45%	
Protéinase K (Sigma-Aldrich)	0.5mg/ml	Protéinase : Lyse les protéines et déroule l'ADN

Lorsque les insectes sont placés dans la solution d'extraction, la plaque est scellée avec une feuille d'aluminium thermocollante et placée toute une nuit dans une étuve à 37°C. Le lendemain, la protéinase K est désactivée 10 minutes à 90C° dans un thermocycleur. Après une brève centrifugation, 35µL d'eau pure HPLC est ensuite ajoutée dans chaque puits. Les ADN extrait sont par la suite conservés à -20°C.

ANNEXE 4 : PROFIL DES INDIVIDUS MEAM1, IO ET HYBRIDES SUR GEL

Après que l'extraction soit effectuée, une PCR en utilisant l'amorce MS145 est effectuée.

Tableau A2 : Détail de l'amorce MS145 : Motif de l'amorce, la taille attendue et référence.

Noms de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Taille attendue (pb)	Référence
Ms145		175 pour IO	Dalmon et <i>al.</i> (2008)
		220 pour MEAM1	

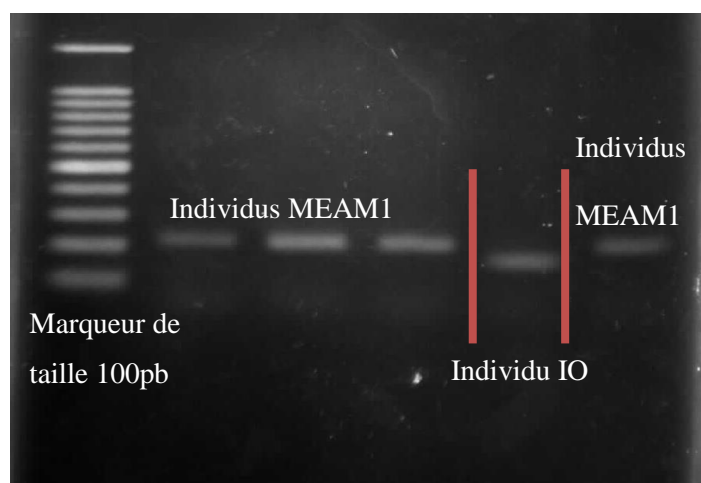
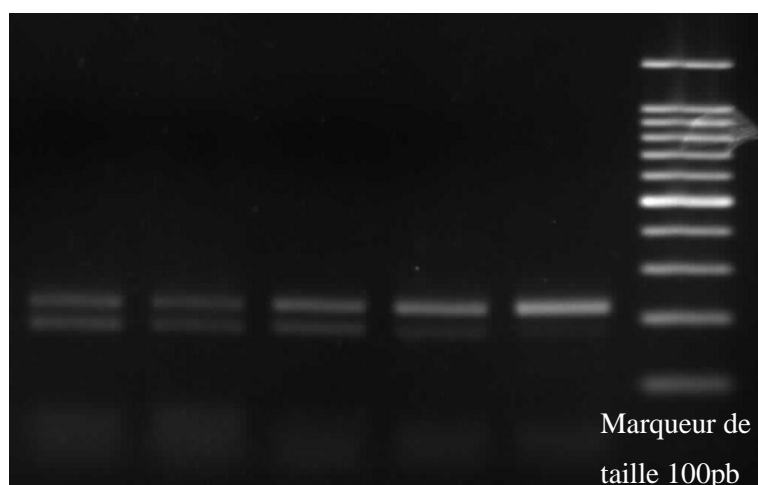


Figure 4.1 : Profils d'individus MEAM1 (220pb) et IO (175pb) en F0.



Annexe 4.2 : Profils de femelles hybrides en F1.

ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE DETECTION DES MICROSATELLITES NUCLEAIRE

Tableau 3 : Séquences des microsatellites, motifs, tailles attendues et références (données issu de Delatte et *al.* 2006).

Noms des amorces	Séquences et fluorochrome ((5' → 3'))	Taille attendue (pb)	Références
Mix 1			
P7-F	TTT G CGTAATGGTAACATGTTTAGAAAA	176	Delatte et <i>al.</i> (2006)
P7-R	AGGGTGTCAGGTCAGGTAGC- HEX		
P32-F	TTTGAGCTCCGCCCTTAAATTGTT	199	Delatte et <i>al.</i> (2006)
P32-R	GCTCAAAATTGTTGGCTCTGA- NED		
P53-F	TTGTGGAGCATATAGCCTTTTTTG	148	Delatte et <i>al.</i> (2006)
P53-R	TTCGTAACGTCTTTAAATTTTGC- FAM		
P62-F	TTT G GCGCAATTTTATAGCGTCTGT	209	Delatte et <i>al.</i> (2006)
P62-R	CTTCCTTAGCACGGCAGAAT- FAM		
Bem25-F	AAGAACTAGCCAGGGACAAAC	-	De Barro et <i>al.</i> (2003)
Bem25-R	TGAAGAATAAGAATAAAGAAGG		
41-F	TT G TGTTAGGATGATAGGCTTGGA	165	Delatte et <i>al.</i> (2006)
41-R	AATCTTAGTGCTAAAGTTTTCTT- FAM		
Mix 2			
11-F	TTT G GATCTGGGTGTTTTCTTCTA	180	Delatte et <i>al.</i> (2006)
11-R	CCAGAAAAGTGGACTTAAGA- HEX		
59-F	TTTGCCAACTGAAGCACATCAATCA	208	Delatte et <i>al.</i> (2006)
59-R	CGGCGTTTCTCGTTTTCTT- FAM		
5-F	TTT G CAAAAACAAAAGCATGTGTCAAA	207	Delatte et <i>al.</i> (2006)
5-R	ATTAGCCTTGCTTGGGTCCT- NED		
MS145-F	-	-	Dalmon et <i>al.</i> (2008)
MS145-R	-		

ANNEXE 6 : PROTOCOLE DE DETECTION DES ENDOSYMBIOTES SECONDAIRES

Les réactions de PCR multiplexe ont été réalisées dans un volume final de 15µL. Le volume et la composition des réactifs utilisés sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Tableau A2 : Composition des réactifs utilisés pour la PCR multiplexe endosymbiotes secondaires : Noms des réactifs, le volume par puits et composition.

Réactifs	Vol/puits	Composition
Master Mix Type-It ® (Quiagen)	7,5µL	dNTP mix ; HotStarTaq® DNA polymérase ; 3mM de Mgcl ₂
Primer Mix	1,5	12µL des amorces Ars-23S1, Ars-23S2 (<i>Arsenophonus</i>) 4,5µL des amorces CFB-F, CFB-R(<i>Cardinium</i>), Hb-F, Hb-R (<i>Hamiltonella</i>), Rb-F, Rb-R (<i>Rickettsia</i>)
Extrait d'AND	2µL	-
Eau Pure	4µL	-

Les détails des amorces utilisées pour la PCR multiplexe endosymbiotes secondaires sont indiqués dans le Tableau A3.

Tableau A3 : Détail des amorces de la PCR multiplexe endosymbiote secondaire

Séquences des microsatellites des endosymbiotes et les gènes sur lesquelles elles sont localisées, motifs, tailles des allèles attendues (en pb) et références où les amorces ont été identifiées. F : Forward ; R : Reverse ; rADN : ADN ribosomique

Gène et endosymbiote	Nom de l'amorce	Séquence des amorces et fluorochrome (5' → 3')	Taille attendue (pb)	Référence
<i>16S rDNA, Rickettsia</i>	Rb-F	GCTCAGAACGAACGCTATC	900	Gottlieb et <i>al.</i> (2006)
	Rb-R	GAAGGAAAGCATCTCTGC-NED		
<i>16S rDNA, Hamiltonella</i>	Hb-F	TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG	700	Zchori-Fein & Brown (2002)
	Hb-R	AGTTCAAGACCGCAACCTC-VIC		
<i>23S rDNA, Arsenophonus</i>	Ars-23S1	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA	600	Thao & Bauman (2004)
	Ars-23S2	GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC-PET		
<i>16S rDNA, Cardinium</i>	CFB-F	GCGGTGTAAAATGAGCGTG	450	Weeks et <i>al.</i> (2003)
	CFB-R	CCTMTTCTTAACCTCAAGCCT-FAM		

Programme PCR. Les réactions de PCR sont programmées dans un thermocycleur. Le programme comprend une première étape de dénaturation de l'ADN et de l'activation de la Taq de 15 minutes à 95°C. Suivent 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN de 30 secondes à 95°C, une étape d'hybridation des amorces de 1 minute et trente seconde à 55°C et une étape de polymérisation de 30secondes à 72°C. Une étape de polymérisation finale de 30 minutes à 72°C est réalisée à la fin du 35^{ème} cycle.

Avant de passer les produits PCR au génotypeur, il est nécessaire de vérifier que les ADN ont été correctement amplifiés. De plus cette étape de vérification permet de choisir la dilution la plus adaptée pour l'analyse avec le génotypeur. Pour cela, µL des produits PCR et un témoin négatif sont déposés sur gel d'agarose à 2%.

Analyses au génotypeur. Les produits PCR sont dilué au 1/20^{ème}, puis 1µL de cette dilution est ajoutée à 10,9µL de Hi-Di-formamideTM (AppliedBiosystems), et 0,1 µL de marqueur de

taille (GeneScan 1200LIZ®). Les échantillons sont ensuite analysés par un séquenceur capillaire ABI Prism 3100 Genetic Analyser (AppliedBiosystems). Finalement, la lecture des résultats se fait sur GeneMapper® v4.0.

Tableau A5 : Détail des amorces des PCR de vérification.

Séquences des microsatellites des endosymbiotes et les gènes sur lesquelles elles sont localisées, motifs, tailles des allèles attendues (en pb) et références où les amorces ont été identifiées. F : Forward ; R : Reverse ; rADN : ADN ribosomique

Gène et endosymbiote	Nom de l'amorce	Séquence des amorces (5' → 3')	Taille attendue (pb)	Référence
<i>16S rDNA, Rickettsia</i>	Rb-F	GCTCAGAACGAACGCTATC	900	Gottlieb et <i>al.</i> (2006)
	Rb-R	GAAGGAAAGCATCTCTGC		
<i>16S rDNA, Hamiltonella</i>	Hb-F	TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG	700	Zchori-Fein & Brown (2002)
	Hb-R	AGTTCAAGACCGCAACCTC		
<i>23S rDNA, Arsenophonus</i>	Ars-23S1	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA	600	Thao & Bauman (2004)
	Ars-23S2	GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC		
<i>16S rDNA, Cardinium</i>	CFB-F	GCGGTGTAAATGAGCGTG	450	Weeks et <i>al.</i> (2003)
	CFB-R	CCTMTTCTTAACCTCAAGCCT		

Programme PCR. Le programme utilisé est le même que précédemment Lorsque le produit PCR est obtenu, 10µL est chargé sur gel d'agarose à 2%. La lecture se fait directement sur le gel.

Duplexe de vérification. Les duplexes de vérification se font dans les mêmes conditions que la multiplexe, à l'exception que le primer mix n'est composé que de deux couples d'amorces (0,15µL de . Les résultats sont lus sur gel d'agarose à 2%.

Simplexe de vérification. Elle se fait dans les mêmes conditions que la détection de l'endosymbiote primaire (Voir annexe 6).

ANNEXE 7 : PROTOCOLE DE DETECTION DE L'ENDOSYMBIOTE PRIMAIRE *PORTIERA*

Tableau A6 : Détail des amorces de la PCR multiplexe endosymbiote secondaires

Séquences des microsatellites de l'endosymbiotes primaire *Portiera* et le gène sur lequel elle est localisée, motifs, tailles de l'allèle attendue (en pb) et référence où l'amorces a été identifiés. F : Forward ; R : Reverse ; rADN : ADN ribosomique

Gène et endosymbiote	Nom de l'amorce	Séquence des amorces (5' → 3')	Taille attendue (pb)	Référence
<i>16S rDNA, Portiera</i>	Port-F	GGAAACGTACGCTAATAC	900	Thierry et <i>al.</i> (2011)
	Port-R	TGACGACAGCCATGCAGCAC		

Les réactions PCR simplexe ont été réalisées dans un volume de 15µL, le volume et la concentration des réactifs utilisés sont détaillée ci-dessous.

Tableau A7 : Composition des réactifs et volume utilisé pour la PCR simplexe endosymbiote primaire *Portiera* : Noms de réactifs et volume par puits.

Réactifs	Vol/puits
H2O	4,5µL
Master Mix Type-It ® (Quiagen)	7,5µL
Amorce Port-F (20µM)	0,5µL
Amorce Port-R (20µM)	0,5µL
Extrait d'ADN	2µL

Programme PCR. Les réactions de PCR sont programmées dans un thermocycleur. Le programme comprend une première étape de dénaturation de l'ADN et de l'activation de la Taq de 15 minutes à 95°C. Suivent 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN de 1 minute à 95°C, une étape d'hybridation des amorces de 1 minute à 55°C et une étape de polymérisation de 1 minute à 72°C. Une étape de polymérisation finale de 10 minutes à 72°C est réalisée à la fin du 35^{ème} cycle.

ANNEXE 8 : COMBINAISON ENDOSYMBIOTIQUES POUR LES CROISEMENTS INTERSPECIFIQUES

Tableau A8 : Effectifs et fréquences des différent combinaisons endosymbiotiques en F0, F1 et F2 pour les croisements issus de mères IO et de mères MEAM1.

H : *Hamiltonella* ; R : *Rickettsia* ; HR : *Hamiltonella/Rickettsia* ; Nd. : endosymbiote secondaire non détecté

A	♀IO			Nd.	♂MEAM1			Nd.
	A	C	C/A		H/R	H	R	
F0 n=75 (47♀ et 28 ♂)	2 (♀)	13 (♀)	24 (♀)	8 (♀)	11 (♂)	3 (♂)	11 (♂)	3 (♂)
	0,04 (a)	0,28 (a)	0,51 (a)	0,17 (a)	0,39	0,11	0,39	0,11
F1 (♀) n= 30	3 (a)	10	12	5				
	0,10 (a)	0,33 (a)	0,40 (a)	0,1 (a)7				
F2 n= 23 (5♀ et 18 ♂)	0	9 (a)	1	13				
	0,00 (a)	0,39 (a)	0,04 (b)	0,57 (b)				

B	♀MEAM1			Nd.	♂IO			Nd.
	H	R	HR		A	C	C/A	
F0 n=67 (60♀ et 11 ♂)	1 (♀)	39 (♀)	14 (♀)	6 (♀)	0 (♂)	4 (♂)	1 (♂)	6 (♂)
	0,02 (a)	0,65 (a)	0,23 (a)	0,10 (a)	0,00	0,36	0,09	0,55
F1 (♀) n= 10	0	4	6	0				
	0,00 (a)	0,40 (a)	0,60 (a)	0,00 (a)				
F2 n= 83 (9♀ et 74 ♂)	1	50 (a)	25	7				
	0,01 (a)	0,60 (a)	0,30 (a)	0,08 (b)				

Les analyses statistiques (test de Fisher) pour les endosymbiotes entre les trois populations sont indiquées avec des lettres. Les proportions avec des lettres qui diffèrent sont significativement différentes (P-val <0,05)

Résumé:

L'aleurode *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) est un ravageur des cultures mondiale et un vecteur de nombreux virus de plantes. Ce complexe d'espèce est composé d'espèces morphologiquement indiscernable dont le statu taxonomique reste controversé. Les objectifs de cette études étaient : i) de faire des croisements interspécifiques entre les espèces MEAM1 et IO et de voir s'il est possible d'obtenir une descendance des ces croisements sur plusieurs générations ii) de déterminer s'il y a une perte de la valeur sélective de la descendance hybrides et iii) de caractériser la diversité des endosymbiotes des parents et des hybrides.

Nous avons établi 86 croisements inters-espèces entre deux espèces trouvées à la Réunion. Les insectes ont été récoltés, sexés et comptés à chaque génération et la diversité des allèles nucléaires et endosymbiotiques ont été analysés. Nous avons montré pour les croisements femelle MEAM1 x mâle IO que le pourcentage de succès était de 59,53% dans la production de descendance tandis que pour les croisements femelle IO x mâle MEAM1 le pourcentage était de 34,88, mais la valeur sélective en F1 et F2 était significativement plus faible que pour les croisements intraspécifiques contrôles. Ceci suggère l'existence d'une barrière pré- ou post zygotique à l'hybridation De plus, pour les hybrides en F1 issus des croisements femelle IO x mâle MEAM1, il y a une réduction significative dans l'apparition d'*Arsenophonus*.

Mots clés : *Bemisia tabaci*, hybridation, endosymbiote secondaire, isolement reproductive partiel, croisement interspécifique

Abstract:

The whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is a worldwide pest and a vector of numerous plant viruses. This species complex is composed of morphologically indistinguishable species and its taxonomic status is still controversial. The objectives of this study were: i) to make inter-specific crosses between MEAM1 and IO species and to find out if it's possible to obtain progeny from these crosses for several generations; ii) to determine if there is any fitness depression in hybrid progeny; and, iii) to characterize the diversity of endosymbionts of both parents and progeny.

We established 86 inter-species crosses among the two species found in La Réunion. Insects were collected, sexed and counted for each generation, and nuclear allelic and endosymbiotic diversity were analyzed. We showed that for MEAM1female x IO male crosses there was a 39.53% rate of success in producing progeny, whilst for IO females x MEAM1 males the rate was 34.88%, but the fitness in F1 and F2 was significantly lower than for the intra-specific control crosses. This suggests the occurrence of a pre- or post zygotic barrier to hybridization. In addition, for F1 hybrids derived from IO female x MEAM1 male crosses, there was a significant reduction in the frequency of occurrence of *Arsenophonus*.

Keywords: *Bemisia tabaci*, hybridization, secondary endosymbionts, partial reproductive isolation, interspecific crossing